(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3934676号
(P3934676)
(45)発行日　平成19年6月20日(2007.6.20)　(24)登録日　平成19年3月30日(2007.3.30)

(51)Int.Cl.		F I	
C09B 15/00	(2006.01)	C09B 15/00	
C07D 219/04	(2006.01)	C07D 219/04	
C12Q 1/28	(2006.01)	C12Q 1/28	
G01N 21/78	(2006.01)	G01N 21/78	C

請求項の数 66　(全 35 頁)

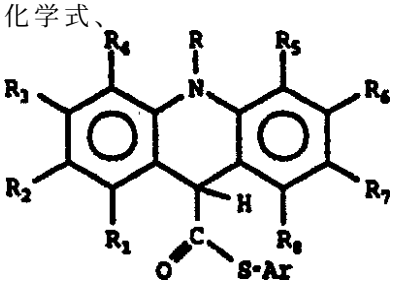
(21)出願番号　特願平7-526956
(86)(22)出願日　平成7年3月8日(1995.3.8)
(65)公表番号　特表平9-512041
(43)公表日　平成9年12月2日(1997.12.2)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/002918
(87)国際公開番号　WO1995/028495
(87)国際公開日　平成7年10月26日(1995.10.26)
審査請求日　平成14年2月25日(2002.2.25)
(31)優先権主張番号　228,290
(32)優先日　平成6年4月15日(1994.4.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ルミゲン　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ミシガン　４８０３４　サウスフィールド　ダブリュー　テン　マイル　ロード　２４４８５　リバーウッド　リサーチ　センター
(74)代理人
弁理士　本多　一郎
(72)発明者　ハシェム　アクハヴァン－タフティ
アメリカ合衆国　ミシガン　４８３１０　スターリング　ハイツ　リアン　ロード　３３８５８

最終頁に続く

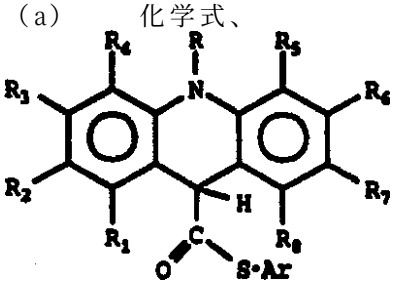
(54)【発明の名称】化学発光検出に有用な新規なアリール　Ｎ－アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
化学式、

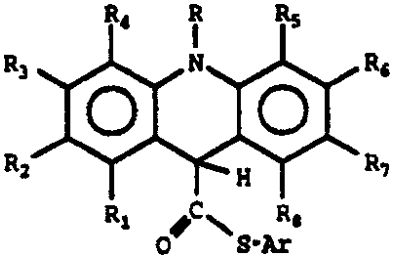


（ここで、Ｒはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダン。
【請求項２】
Arが未置換のアリール基である請求の範囲第1項記載のアクリダン。
【請求項３】
未置換のアリール基がフェニル基及びナフチル基より選択された基である請求の範囲第2項記載のアクリダン。
【請求項４】

Arが置換されたアリール基である請求の範囲第１項記載のアクリダン。
【請求項５】
置換されたアリール基が置換されたフェニル基及び置換されたナフチル基より選択された基である請求の範囲第4項記載のアクリダン。
【請求項６】
R_1からR_8までの基の少なくとも１個がアルコキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第1項乃至第5項のうちいずれか1項記載のアクリダン。
【請求項７】
R_1からR_8までの基の少なくとも１個がメトキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第1項乃至第5項のうちいずれか１項記載のアクリダン。
【請求項８】
（a）　化学式、



（ここで、Ｒはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、
（b）　場合により、該アクリダンからの発光を強化し得るフェノール化合物と、
（c）　該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応に関係する過酸化化合物と、
（d）　試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、
（e）　化学発光を改良し得る量の界面活性剤と、
を含有することを特徴とする、ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物。
【請求項９】
Arが未置換のアリール基である請求の範囲第8項記載の試薬組成物。
【請求項１０】
未置換のアリール基がフェニル基及びナフチル基より選択された基である請求の範囲第9項記載の試薬組成物。
【請求項１１】
Arが置換されたアリール基である請求の範囲第8項記載の試薬組成物。
【請求項１２】
置換されたアリール基が置換されたフェニル基及び置換されたナフチル基より選択された基である請求の範囲第11項記載の試薬組成物。
【請求項１３】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がアルコキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第8項乃至第12項のうちいずれか1項記載の試薬組成物。
【請求項１４】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がメトキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第8項乃至第12項のうちいずれか1項記載の試薬組成物。
【請求項１５】
過酸化化合物とペルオキシダーゼと、化学式、



（ここで、Ｒはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンとの反応を含むことを特徴とする化学発光を生ずる方法。

【請求項１６】

Arが未置換のアリール基である請求の範囲第15項記載の方法。

【請求項１７】

未置換のアリール基がフェニル基及びナフチル基より選択された基である請求の範囲第16項記載の方法。

【請求項１８】

Arが置換されたアリール基である請求の範囲第15項記載のアクリダン。

【請求項１９】

置換されたアリール基が置換されたフェニル基及び置換されたナフチル基より選択された基である請求の範囲第18項記載の方法。

【請求項２０】

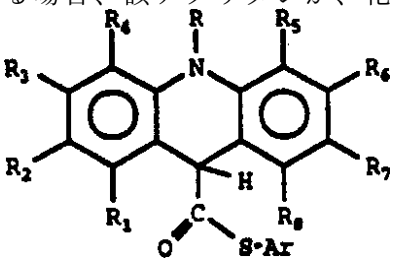
R_1からR_8までの基の少なくとも１個がアルコキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第15項乃至第19項のうちいずれか１項記載の方法。

【請求項２１】

R_1からR_8までの基の少なくとも1個がメトキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第15項乃至第19項のうちいずれか1項記載の方法。

【請求項２２】

試料物質を化学発光反応によりアッセイ法で検出する方法において、
該試料物質検出のための発光にアクリダンを過酸化物およびペルオキシダーゼと反応させる場合、該アクリダンが、化学式、



（ここで、Ｒはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンであることを特徴とする検出方法。

【請求項２３】

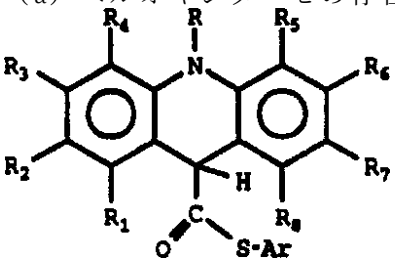
Arが未置換のアリール基である請求の範囲第22項記載の検出方法。

【請求項２４】

未置換のアリール基がフェニル基及びナフチル基より選択された基である請求の範囲第23項記載の検出方法。

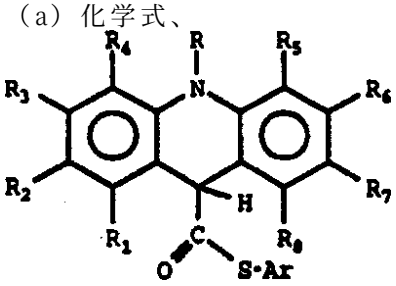
【請求項２５】

Arが置換されたアリール基である請求の範囲第22項記載の検出方法。
【請求項２６】
置換されたアリール基が置換されたフェニル基及び置換されたナフチル基より選択された基である請求の範囲第25項記載の検出方法。
【請求項２７】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がアルコキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第22項乃至第26項のうちいずれか１項記載の検出方法。
【請求項２８】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がメトキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第22項乃至第26項のうちいずれか1項記載の検出方法。
【請求項２９】
試料物質が、ペルオキシダーゼである請求の範囲第22項記載の検出方法。
【請求項３０】
試料物質が、過酸化物である請求の範囲第22項記載の検出方法。
【請求項３１】
試料物質を化学発光反応によるアッセイ法で検出する方法において、
（a）ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物であって、化学式、

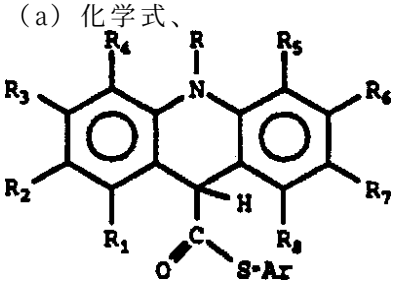


（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、場合により、該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物と、該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応に関係する過酸化化合物と、該試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、化学発光を改良し得る量の界面活性剤とを含有する該試薬組成物を与えることと、
（b）　該試料物質検出のため該試薬組成物にペルオキシダーゼを添加して発光させること、
とを含むことを特徴とする検出方法。
【請求項３２】
Arが未置換のアリール基である請求の範囲第31項記載の検出方法。
【請求項３３】
未置換のアリール基がフェニル基及びナフチル基より選択された基である請求の範囲第32項記載の検出方法。
【請求項３４】
Arが置換されたアリール基である請求の範囲第31項記載の検出方法。
【請求項３５】
置換されたアリール基が置換されたフェニル基及び置換されたナフチル基より選択された基である請求の範囲第32項記載の検出方法。
【請求項３６】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がアルコキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第31項乃至第35項のうちいずれか1項記載の検出方法。
【請求項３７】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がメトキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水

素原子である請求の範囲第31項乃至第35項のうちいずれか1項記載の検出方法。
【請求項３８】
試料物質が、ペルオキシダーゼである請求の範囲第31項記載の検出方法。
【請求項３９】
試料物質が、過酸化物である請求の範囲第31項記載の検出方法。
【請求項４０】
試料物質を化学発光反応によるアッセイ法で検出するためのキットにおいて、
（a）化学式、



（ここで、Ｒはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、
（b）　過酸化物と、
（c）　アクリダン化合物を過酸化物およびペルオキシダーゼと反応させることによるアッセイ法で光を検出する場合、単独のペルオキシダーゼと、または試料物質と結合した化合物に付着した形のペルオキシダーゼと、
をそれぞれ独立した容器で供給することを特徴とするキット。
【請求項４１】
Arが未置換のアリール基である請求の範囲第40項記載のキット。
【請求項４２】
未置換のアリール基がフェニル基及びナフチル基より選択された基である請求の範囲第41項記載のキット。
【請求項４３】
Arが置換されたアリール基である請求の範囲第40項記載のキット。
【請求項４４】
置換されたアリール基が置換されたフェニル基及び置換されたナフチル基より選択された基である請求の範囲第43項記載のキット。
【請求項４５】
R_1からR_8までの基の少なくとも１個がアルコキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第40項乃至第44項のうちいずれか1項記載のキット。
【請求項４６】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がメトキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第40項乃至第44項のうちいずれか1項記載のキット。
【請求項４７】
試料物質を化学発光反応によるアッセイ法で検出するためのキットにおいて、
（a）化学式、



（ここで、Ｒはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、場合により、該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物と、該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応に関係する過酸化化合物と、該試薬への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、化学発光を改良し得る量の界面活性剤とを含有する、ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物と、
（b）　試薬組成物をペルオキシダーゼと反応させることによるアッセイ法で光を検出する場合、単独のペルオキシダーゼと、または試料物質と結合した化合物に付着した形のペルオキシダーゼと、
をそれぞれ独立した容器で供給することを特徴とするキット。
【請求項４８】
Arが未置換のアリール基である請求の範囲第47項記載のキット。
【請求項４９】
未置換のアリール基がフェニル基及びナフチル基より選択された基である請求の範囲第48項記載のキット。
【請求項５０】
Arが置換されたアリール基である請求の範囲第47項記載のキット。
【請求項５１】
置換されたアリール基が置換されたフェニル基及び置換されたナフチル基より選択された基である請求の範囲第50項記載のキット。
【請求項５２】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がアルコキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第47項乃至第51項のうちいずれか1項記載のキット。
【請求項５３】
R_1からR_8までの基の少なくとも1個がメトキシ基であり、R_1からR_8までの他の基が水素原子である請求の範囲第47項乃至第51項のうちいずれか1項記載のキット。
【請求項５４】
フェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項５５】
4'-ヒドロキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項５６】
2',6'-ジメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項５７】
4'-フルオロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項５８】
4'-トリフルオロメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項５９】
4'-メトキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項６０】
2',6'-ジクロロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項６１】
2'-ナフチル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項６２】
2'-ナフチル　2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項６３】
4'-フルオロフェニル　3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート。
【請求項６４】
アクリダンが、フェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-ヒドロキ

シフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2',6'-ジメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-フルオロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-トリフルオロメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-メトキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2',6'-ジクロロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2'-ナフチル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2'-ナフチル　2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート及び4'-フルオロフェニル　3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートから成る群から選択されたアクリダンである請求の範囲第8項記載の試薬組成物。

【請求項６５】

アクリダンが、フェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-ヒドロキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2',6'-ジメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-フルオロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-トリフルオロメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-メトキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2',6'-ジクロロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2'-ナフチル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2'-ナフチル　2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート及び4'-フルオロフェニル　3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートから成る群から選択されたアクリダンである請求の範囲第15項、第22項または第31項記載の方法。

【請求項６６】

アクリダンが、フェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-ヒドロキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2',6'-ジメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-フルオロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-トリフルオロメチルフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、4'-メトキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2',6'-ジクロロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2'-ナフチル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート、2'-ナフチル　2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート及び4'-フルオロフェニル　3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートから成る群から選択されたアクリダンである請求の範囲第40項または第47項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、過酸化物およびペルオキシダーゼとの反応によりアクリダンが発光（化学発光）する、化学発光性N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体に関する。本出願は、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素などのオキシダントと、ある種のアリール N-アルキルアクリダンカルボキシレートチオエステルとの作用により、化学的に発光（化学ルミネセンス）させるための改良された方法に関する。本出願はまた、特定の物質を用いて前記方法による化学発光の発光量を増大させるための改良された方法に関する。本出願はまた、前記方法を用いたペルオキシダーゼの検出に関する。本出願はまた、前記方法を用いた過酸化水素の検出に関する。本出願はまた、前記方法を用いた様々な生体分子の検出および定量に関する。たとえば、この方法は、イムノアッセイの技術によるハプテン、抗原、抗体の検出、ウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出、サザンブロッティングおよびノーザンブロッティングによるDNA、RNAの検出に用いることができる。さらに、この方法は、DNAの配列決定におけるDNA検出に用いることができる。さらに、この方法は、従来知られているように、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼなど、過酸化水素を生成する酵素の検出に用いることができる。

背景技術

生体分子を感度よく検出および定量する方法としては、これまで特定分子を放射性同位元

素で標識する方法が使われてきた。最近になって、放射性物質の持つ危険性やその取り扱いの難しさを解消するため、放射性物質を使わない技術が数多く開発されてきている。試料物質を酵素と結合させ、その触媒作用による基質の反応を測定する方法を使えば、増幅した形で反応が観測されるため、最も高感度で検出を行うことができる。そのため、着色光、蛍光、化学発光を発生する基質が作られるようになり、特に化学発光による高感度の検出が可能となってきている。

測定の感度がさらに向上すれば、微量物質の検出が可能となり、また測定に必要な時間や試薬の量が削減できるため、化学発光の用途は一層広がる。このような酵素を用いた化学発光アッセイの検出速度および感度を向上させるためには、たとえば基質としてより発光効率が高い物質、または長時間発光可能な物質を選ぶ必要がある。

イムノアッセイ、オリゴヌクレオチドの検出、およびハイブリッド核酸の作成などの酵素結合法を用いた検出に使われる酵素としては、これまでホースラディッシュペルオキシダーゼが最も一般的だった。従来知られている化学発光用の試薬では、分析時の感度の限界などにより、この酵素の特性を最大限に活かすことができなかった。ペルオキシダーゼ抱合体（conjgate）を用いて超高感度の検出を行うには、より微量な酵素の検出ができる試薬が要求される。具体的には、バックグラウンドの発光レベルや分析に不要な領域の発光レベルを上げることなく、特定領域において高い発光レベルを持つような試薬が必要である。このためには、従来よりも最大光度を上げるか、または発光持続時間を長くする必要がある。

a. アクリダンの酸化

過酸化ベンゾイル水溶液中でのアクリダンの酸化では、発光効率は非常に低く（$\Phi_{CL}=3\times10^{-7}$）、しかもアクリジンなどの副生成物が生ずる（S. Steenken, Photochem. Photobiol., 11, 279-283（1970））。N-メチルアクリダンは電気化学的に酸化されてN-メチルアクリジニウムとなる（P. Hapiot, J. Moiroux, J. M. Saveant, J. Am. Chem. Soc., 112（4）, 1337-43（1990）; N. W. Koper, S. A. Jonker, J. W. Verhoeven, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 104（11）, 296-302（1985））。N-アルキルアクリダン化合物の化学的酸化は、ヘキサシアノ鉄（　）酸イオン（A.Sinha,T. C. Bruice, J. Am. Chem. Soc., 106（23）, 7291-2（1984））、ある種のキノン類（A. K. Colter, P. Plank, J. P. Bergsma, R. Lahti, A. A. Quesnel, A. G. Parsons, Can. J. Chem., 62（9）, 1780-4（1984））、亜硝酸リチウム（O. N. Chupakhin, I. M. Sosonkin, A. I. Matern, G. N. Strogov, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 250（4）, 875-7（1980））によって行われてきた。N-アルキルアクリダン誘導体の酸化は、コオキシダントとなるフラビン化合物の存在下または非存在下で、電気化学的に行われてきた（W. R. Knappe, J. Pharm. Sci., 67（3）, 318-20（1978）; G. A. Digenis, S. Shakshir, M. A. Miyamoto, H. B. Kostenbauer, J. Pharm. Sci., 65（2）, 247-51（1976））。

10-メチルアクリダン-9-カルボン酸のアリールおよびアルキルエステルは、強塩基性の双極中性溶媒中で自動酸化されてN-メチルアクリドンとなり、化学発光を起こす（F. McCapra, Accts. Chem. Res., 9（6）, 201-8（1976）; F. McCapra, M. Roth, D. Hysert, K. A. Zaklika in Chemiluminescence and Bioluminescence, Plenum Press, New York, 1973, pp. 313-321; F. McCapra, Prog. Org. Chem., 8, 231-277（1971）; F. McCapra, Pure Appl. Chem., 24, 611-629（1970）; U.S. Patent No. 5,283,334 and 5,284,951 to McCapra, and 5,284,952 to Remakrishnam）。化学発光の量子収量は、10^{-5}から0.1の範囲で、脱離するフェノールまたはアルコールのpKaが低下するのにしたがって増大することが分かっている。また、水溶液中では、中間生成物が発光を伴わない競合反応により分解するため、量子収量が有意に低下した。カチオン界面活性剤（CTAB）を添加すると、この競合反応が抑制されるため、見かけの光収量は130倍に増大した。

本出願人による同時係属出願となる1993年5月17日出願のNo.08/061,810及び1994年3月2日出願のNo.08/205,093では、酵素を用いてN-アルキルアクリダンカルボン酸誘導体およびその置換体を酸化することにより、化学発光を起こさせる方法が初めて開示されている。ペルオキシダーゼおよび過酸化物の存在下で、N-アルキルアクリダンカルボン酸誘導体は

効率的に酸化されてN-アルキルアクリドンとなるとともに、化学発光による青色光を生ずる。

b. アクリジニウムエステルの酸化による化学発光

N-アルキルアクリジニウムカルボン酸の脂肪族および芳香族エステルをアルカリ性溶液中でH_2O_2により酸化することにより発光させる反応はよく知られている。この場合の化学発光の量子収量は0.1と高いため、生体分子に結合する反応基を持った誘導体を開発することができるようになり、アクリジニウムエステルを標識とした化学発光によるイムノアッセイやオリゴヌクレオチドプローブアッセイが多数報告されるようになり、特に前記U.S. Patent No.5,284,951及び5,284,952に記載されている。

アクリジニウムエステル（AE's）を使用する場合、特にタンパク質やオリゴヌクレオチドを標識する場合には、2つ問題がある。まず第1に、加水分解の安定性が低いことである。アクリジニウムエステル抱合体は、室温またはそれよりやや高い温度で、徐々に分解が進行する。長期間保存するには、脱離基の性質にもよるが、-20℃に保つことが必要となる。

アクリジニウムエステルの第2の問題は、水などのような求核性試薬を9-部位に付加することによって自発的に擬似塩基性の中間物を生成し、これがpH値によっては発光を伴わずに分解反応を起こすことである。したがって実際に反応させる際には、アクリジニウムエステルを含む溶液のpHを、はじめは擬似塩基の生成を防ぐため低く保ち、H_2O_2添加後は発光を起こさせるため高くする必要がある。

N-アルキルアクリジニウムカルボン酸のアミド、チオエステル、スルホンアミドも、同様の条件で酸化されることにより、発光することが分かっている（T. Kinkel, H. Lubbers, E. Schmidt, P. Molz, H. J. Skripczyk, J. Biolumin. Chemilumin., 4. 136-139, （1989）; G. Zomer, J. F. C. Stavenuiter, Anal. Chim. Acta, 227, 11-19（1989））。しかし、このように脱離基を変えても、貯蔵安定性はわずかしか向上しない。

アクリジニウムエステルの化学発光を利用して標識を行う際に、より根本的な問題は、標識分子としてタンパク質やオリゴヌクレオチドに直接結合させると、多くても10分子程度しか結合できないということにある。発光時の量子収量（≦10%）を考えると、アクリジニウムエステルで標識した試料物質は、多くても光子1個分の光しか生じないことになる。これに対し、試料物質を酵素で標識し、その発光反応を検出するようにすれば、酵素の持つ触媒作用の結果、試料物質1分子当たりの発光量は数桁も高くすることができる。イムノアッセイにおいて試料物質になるべく多くのアクリジニウムエステル分子を結合させるため、不特定の数のアクリジニウムエステルを含むリポソームと抗体との抱合体を作成する方法が採られている（S. J. Law, T. Miller, U. Piran, C. Klukas, S. Chang, J. Unger, J. Biolumin. Chemilumin., 4, 88-98, （1989））。この方法では、アクリジニウムエステルの直接標識による方法と比べ、シグナルはわずかしか増大しない。

c. ホースラディッシュペルオキシダーゼの化学発光検出

ルミノール、イソルミノールなど、アミノ基で置換した環状アシルヒドラジドは、H_2O_2および（ホースラディッシュペルオキシダーゼ、HRPのような）ペルオキシダーゼと塩基性環境でと反応して発光する。この反応は、H_2O_2およびペルオキシダーゼの基本的な検出法として使われてきた。さらにその発展として、ルミノール様物質（8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4（2H,3H）ジオン）を使ったHRPによる化学発光アッセイが行われてきた（M. Ii, H. Yoshida, Y. Aramaki, H. Masuya, T. Hada, M. Terada, M. Hatanaka, Y. Ichimori, Biochem. Biophys. Res. Comm., 193（2）, 540-5（1993））。この化合物をイムノアッセイに利用すると、ルミノールを使った場合と比べ、検出能力が2倍になった。ペルオキシダーゼと過酸化物によって酸化されて発光する化合物としては、他にヒドロキシ基で置換したフタルヒドラジドがある（Akhavan-Tafti, U.S. Patent Application No. 965,231, 1992年10月23日出願）。本出願の原出願となるNo.08/061,810及びNo.08/205,093では、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応して発光する化学発光性N-アルキルアクリダンカルボン酸のエステルおよびスルホンイミドを用いて、ペルオキシダーゼの検出および各種アッセイを行う方法が開示されている。

ルミノールによる発光の光度および持続時間を向上させる手段として、様々な強化剤が用いられている。たとえば、D-ルシフェリンのようなベンゾチアゾール誘導体、p-ヨードフェノールやp-フェニルフェノールを含む種々のフェノール化合物、芳香族アミンなどである（G. Thorpe, L. Kricka, in Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives, J. Scholmerich, et al., Eds., pp. 199-208（1987））。ここでは、フェノール化合物とは、上記のヒドロキシフェノール化合物の置換体の他、2-ナフトール、6-ブロモ-2-ナフトールなど、ペルオキシダーゼによる反応を促進することが知られている化合物を含めた、ヒドロキシル基を持つ芳香族化合物を総称するものとする。アミノ基で置換された環状アシルヒドラジドのペルオキシダーゼによる酸化発光を促進する物質としては、この他に4-（4-ヒドロキシフェニル）チアゾール（M. Ii, H. Yoshida, Y. Aramaki, H. Masuya, T. Hada. M. Terada, M. Hatanaka, Y. Ichimori, Biochem. Biophys. Res. Comm., 193（2）, 540-5（1993））、U.S. Patent No. 5,171,668（Sugiyama）で開示された一群の化合物、2-ヒドロキシ-9-フルオレノン、U.S. Patent No.5,206,149（Oyama）で開示された一群のヒドロキシ化ベンゾキサゾール誘導体などがある。環状アシルヒドラジドが過酸化物およびペルオキシダーゼによって酸化される機構は極めて複雑で、議論が大きく分れている（A. Lundin, L. Hallander, in Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives, J. Scholmerich, et al., Eds., pp. 555-558（1987）; S. Vlasenko, A. Arefyev, A. Klimov, B. Kim, E. Gorovits, A. Osipov, E. Gavrilova, A. Yegorov, J. Biolumin. Chemilumin., 4, 164-176（1989））。そのため、ペルオキシダーゼの触媒作用を利用した発光反応を新たに開発することが困難となっている。

d. HRPによるアッセイ

ホースラディッシュペルオキシダーゼは、ルミノールやイソルミノールを基質とした化学発光の検出による酵素イムノアッセイやDNA ハイブリッド形成アッセイに広く使われるようになっている（G. H. Thorpe, L. J. Kricka, S. B. Mosely, T. P. Whitehead, Clin. Chem., 31, 1335（1985）; J. A. Matthews, A. Batki, C. Hynds, L. J. Kricka, Anal. Biochem., 151, 205（1985）; P. Walsh, J. Varlaro, R. Reynolds, Nuc. Acids Res. 20（19）, 5061-5065（1992））。HRPの抱合によってルミノールの化学発光を強化させるためのキットも市販されている。ペルオキシダーゼによる従来の化学発光アッセイでは、極微量の酵素を検出することができないため、甲状腺ホルモンTSHなどの試料物質に対しては、極微量の検出が不可能だった。このため、より微量の酵素でも検出可能な化学発光試薬が要求されている。

e. 界面活性剤による化学発光の強化

高分子または低分子の界面活性剤により発光反応を促進する方法が従来より知られている。これは、発光体の光量子収量を増大させる、励起状態で生成される目的分子の比率を上げる、競合する副反応を抑制することによって化学発光に関与する分子の比率を上げる（McCapra, Accts. Chem. Res., 9（6）, 201-8（1976））、または触媒として働く酵素の活性を高める、などの方法により、いずれか一つまたは二つ以上の反応段階を操作することによって行われている。高分子または低分子の界面活性剤が発光反応に与える影響については、明確な、あるいは一致したパターンがあるわけではない。したがって、ある特定の反応において、界面活性剤が化学発光を強化するのかどうか、もしするならば、どの界面活性剤がそうなのかというようなことは、実験事実の積み重ねによる以外には予測が不可能である。

U.S. Patent No.5,145,772（Voyta）では、高分子化合物の存在下で酵素による1,2-ジオキセタンの化学発光を強化する方法が開示されている。ここでは、ある種のカチオン性高分子化合物は化学発光の強化に有効であり、非イオン性高分子化合物は概して効果がなく、アニオン性高分子化合物の中では、例45に示すものが唯一発光量を有意に低下させたと述べられている。

U.S. Patent No.4,927,769（Chang）では、過酸化水素を用いて、アルカリ性環境で界面活性剤によるアクリジニウムエステルの化学的酸化を促進する方法が開示されている。ここに記載されているアクリジニウムエステル化合物は、その反応が酵素の使用を伴なわな

いで反応するという点で、本発明のアクリダン化合物とは異なる。実験で使った界面活性剤（該文献の表2参照）の中では、いくつかにおいてわずかな反応促進効果が見られたに過ぎないことが述べられている。

ホタルルシフェリンルシフェラーゼ反応に対する界面活性剤の影響に関する研究（L. J. Kricka, M. DeLuca, Arch. Biochem. Biophys., 217, 674（1983））によると、非イオン界面活性剤による酵素活性の変化の結果として光収量が増大したとされている。また、カチオン界面活性剤の場合は、酵素阻害効果により、発光が完全に消失したという。

また、ある研究（T. Goto, H. Fukatsu, Tetrahedron. Lett., 4299（1969））によると、ウミホタルルシフェリンの化学的酸化による発光において、発光体からの蛍光の量子収量は、カチオン、アニオンおよび非イオン界面活性剤のいずれを使った場合でも増大するが、非イオンおよびカチオン界面活性剤が化学発光を強化するのに対し、アニオン界面活性剤は強化しないことが明らかにされている。

さらに、別の研究（K. Sasamoto, Y. Ohkura, Chem. Pharm. Bull., 39（2）, 411-6（1991））では、環状ジアシルヒドラジドのジアルキルアミノベンゾフラニル化物の化学的酸化による発光が、カチオン界面活性剤によって強化されることがを報告されている。また、アニオン界面活性剤は発光を強化しなかったが、非イオン界面活性剤は発光を低下させたという。

発明の開示

以上に述べたことから、本発明の目的は、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、生体物質および化合物を検出する上で優れた性質を持ったアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体を提供し、さらにそのため改良された方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、溶液中または膜上におけるアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、ペルオキシダーゼおよび酵素抱合体を検出するための改良された方法およびキットを提供することである。さらに、本発明の別の目的は、アリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、溶液中および表面上での核酸アッセイを行うための改良された方法およびキットを提供することである。さらに、本発明の別の目的は、アリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、ウェスタンブロッティングでタンパク質を、サザンブロッティングやその他のDNA ハイブリッド形成アッセイでDNAを検出するための改良された方法およびキットを提供することである。さらに、本発明の別の目的は、アリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、酵素イムノアッセイでハプテン、タンパク質および抗体を検出するための改良された方法およびキットを提供することである。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明によるフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5a）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5aを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5aの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）5aの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図から分かるように、この条件下では、本発明による試薬は、他の試薬と比較して、相対光量単位（RLU）における発光量が大きい。

図2は、本発明による4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5b）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシ

レートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5bを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5bの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）5bの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図2から分かるように、この条件下では、本発明による試薬は、他の試薬と比較して、発光量が大きい。

図3は、本発明による4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5d）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5dを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5dの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）5dの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図3から分かるように、この条件下では、本発明による試薬は、他の試薬と比較して、発光量が大きい。

図4は、本発明による4'-トリフルオロメチルフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5e）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5eを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5eの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）5eの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図4から分かるように、本発明による試薬は、この条件下では、他の試薬と比較して、発光量が大きい。

図5は、本発明による4'-メトキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5f）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5fを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5fの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）5fの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図5から分かるように、この条件下では、本発明による試薬は、他の試薬と比較して、発光量が大きい。

図6は、本発明による2',6'-ジクロロフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5g）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5gを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5gの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）

5gの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図6から分かるように、この条件下では、本発明による試薬は、他の試薬と比較して、発光量が大きい。

図7は、本発明による2-ナフチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5h）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5hを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5hの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）5hの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図7から分かるように、この条件下では、本発明による試薬は、他の試薬と比較して、発光量が大きい。

図8は、本発明による4'-フルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5j）を含む試薬、アクリダンとしてフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびアクリダンとしてエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40μLを1.4×10^{-16}molのHRP水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、（1）0.05mMのアクリダン化合物5jを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、（2）前記の5jの代わりにフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、（3）5jの代わりにエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外は同じ組成の試薬とした。図8から分かるように、この条件下では、本発明による試薬は、他の試薬と比較して、発光量が大きい。

図9は、本発明による試薬とルミノールを含む市販の最適試薬のHRP検出における直線性を比較したグラフである。アクリダン5aを含む試薬および市販の試薬（AMERSHAM ECL）各40μLを、別々に、所定量の酵素を含むHRP試料1Lと室温で混合した。アクリダン5aを含む試薬については15分後のデータを、一方ECL試薬については最大光度を測定した。図中のS-Bとは、HRP存在下でのRLUにおける化学発光シグナル（S）を、HRP不存在下でのバックグラウンドの化学発光（B）に対して補正したものである。アクリダン5aを含む試薬の場合、ECL試薬と比べて検出感度が100倍であった。

図10は、本発明による試薬とルミノールを含む市販の最適試薬のHRP検出における直線性を比較したグラフである。アクリダン5dを含む試薬および市販の試薬（AMERSHAM ECL）各40μLを、別々に、所定量の酵素を含むHRP試料1Lと室温で混合した。アクリダン5dを含む試薬については15分後のデータを、一方ECL試薬については最大光度を測定した。図中のS-Bの意味は図9と同様である。アクリダン5dを含む試薬の場合、ECL試薬と比べて検出感度が100倍であった。

図11は、本発明による試薬とルミノールを含む市販の最適試薬のHRP検出における直線性を比較したグラフである。アクリダン5eを含む試薬および市販の試薬（AMERSHAM ECL）各40μLを、別々に、所定量の酵素を含むHRP試料1Lと室温で混合した。アクリダン5eを含む試薬については15分後のデータを、一方ECL試薬については最大光度を測定した。図中のS-Bの意味は図9と同様である。アクリダン5eを含む試薬の場合、ECL試薬と比べて検出感度が100倍であった。

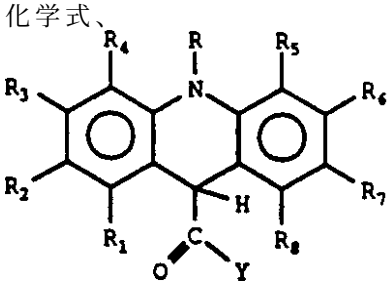
図12は、本発明による試薬とルミノールを含む市販の最適試薬のHRP検出における直線性を比較したグラフである。アクリダン5jを含む試薬および市販の試薬（AMERSHAM ECL）各40μLを、別々に、所定量の酵素を含むHRP試料1Lと室温で混合した。アクリダン5jを含む試薬については15分後のデータを、一方ECL試薬については最大光度を測定した。図中のS-Bの意味は図9と同様である。アクリダン5jを含む試薬の場合、ECL試薬と比べて検出感度が100倍であった。

図13は、分画したヤギ抗ヒトトランスフェリン血清・ウサギ抗ヤギIgGペルオキシダーゼ抱合体を（conjugate）用いた、化学発光検出によるPVDF上でのヒトトランスフェリンのウェスタンブロッティングの実験結果である。ヒトトランスフェリンは、5つのスロットにそれぞれ、（1）1000pg、（2）200pg、（3）50pg、（4）20pg、（5）5pgを加えた。化学発光の検出は、Aはルミノール（ECL）を含む市販の試薬、Bはアクリダンとして本出願の原出願となるNo.08/061,810で開示された4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、Cはアクリダンとして本発明の5aを含む試薬であって、この3種類の試薬を用いて行った。ブロットは14分間インキュベートした後、X-OMAT AR X線フィルムに15秒間暴露した。画像はスキャンしてデジタル信号処理により再生した。本発明によるアクリダン5aで最も優れた結果が得られた。

図14は、フルオレセインで標識したv-mosプローブとホースラディッシュペルオキシダーゼ・抗フルオレセイン抱合体並びにアクリダンとして5aを含む本発明による試薬を使用して、化学発光検出により、ナイロン上でEcoRI制限マウスゲノムDNAのサザンブロッティングを行った結果を示したものである。ブロットは9分間インキュベートした後、X-OMAT AR X線フィルムに10分間暴露した。画像はスキャンしてデジタル信号処理により再生した。その結果、本発明の検出試薬を用いることにより、ブロットの両方のトラックにおいて、シングル複製の遺伝子の画像を得た。

発明を実施するための最良の形態

化学式、

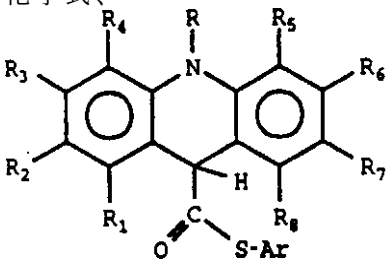


(I)

（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Yは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光（化学発光）させる脱離基（leaving group）である）で表されるアクリダンは、本出願人による同時係属出願となるU.S.Patent No.08/061,810及び08/205,093で開示されている。しかし、アリールチオエステルの誘導体（化学式（I）においてY = S・Ar）など、ある種のアクリダン誘導体が、より優れた化学発光特性を持つことが分かってきた。

本発明は、

化学式、

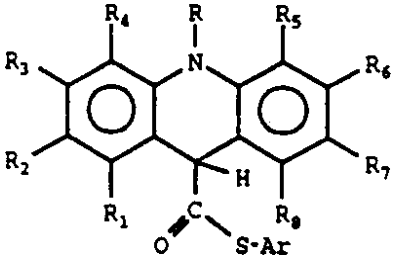


(II)

（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基（特に、フェニル基、ナフチル基及びビフェニル基）並びにヘテロアリール基（特に、ピリジル基、キノリル基及びキサンテニル基）から成る群より選択される基である）で表される改良したアクリダンに関する。

本発明は、ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物に関するものであって、

a)　化学式、



（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基（特に、フェニル基、ナフチル基及びビフェニル基）並びにヘテロアリール基（特に、ピリジル基、キノリル基及びキサンテニル基）から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、

b)　場合により、該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物と、

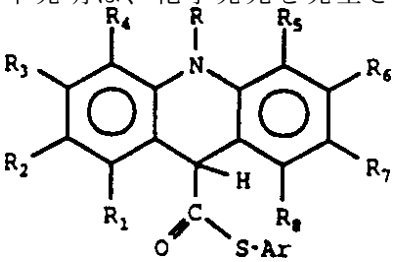
c)　該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応に関わる過酸化化合物と、

d)　該試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、

e)　界面活性剤と、

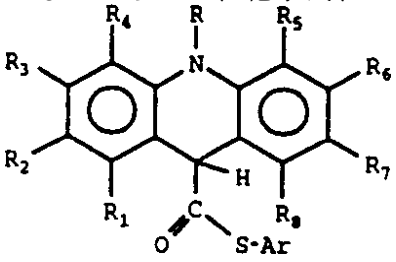
を含むことを特徴とする試薬組成物に関する。

本発明は、化学発光を発生させるための改良された方法に関するものであって、化学式、



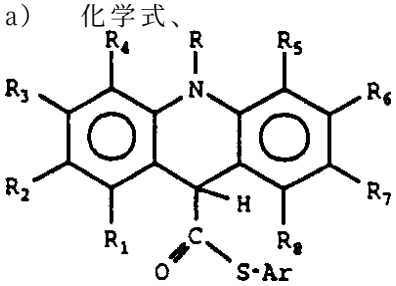
（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基（特に、フェニル基、ナフチル基及びビフェニル基）並びにヘテロアリール基（特に、ピリジル基、キノリル基及びキサンテニル基）から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンを、過酸化化合物およびペルオキシダーゼと反応させることを含むことを特徴とする方法に関する。

本発明はまた、ペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合したもしくは結合可能な試料物質を、化学発光反応によってアッセイ法で検出するための、改良された方法に関するものであって、化学式、

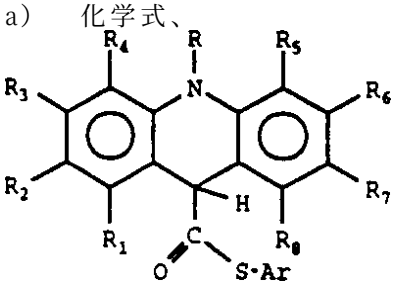


（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基（特に、フェニル基、ナフチル基及びビフェニル基）並びにヘテロアリール基（特に、ピリジル基、キノリル基及びキサンテニル基）から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンを、過酸化物およびペルオキシダーゼとの反応によって発光さ

せることにより、該試料物質を検出することを含むことを特徴とする方法に関する。
本発明はまた、ペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合したもしくは結合可能な試料物質を、化学発光反応によってアッセイ法で検出するための、改良された方法に関するものであって、
a)　化学式、

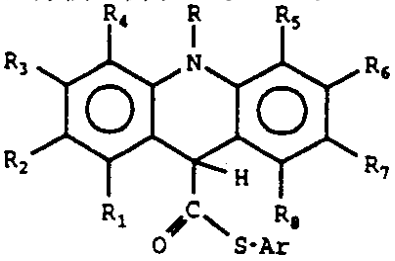


（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基（特に、フェニル基、ナフチル基及びビフェニル基）並びにヘテロアリール基（特に、ピリジル基、キノリル基及びキサンテニル基）から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、
該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応に関わる過酸化化合物と、
該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物などの強化物質と、
該試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、
界面活性剤と、
を含むペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物を与えることと、
b)　該試料物質検出のため該試薬組成物にペルオキシダーゼを添加して発光させることと、
を含むことを特徴とする方法に関する。
本発明はまた、試料物質を化学発光反応の発光によってアッセイ法で検出するためのキットに関するものであって、
a)　化学式、

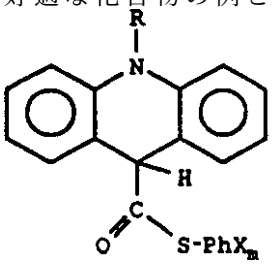


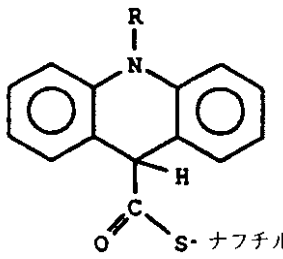
と、
（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基（特に、フェニル基、ナフチル基及びビフェニル基）並びにヘテロアリール基（特に、ピリジル基、キノリル基及びキサンテニル基）から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、
過酸化物と、
場合により、該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物などの強化物質と、
試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、
界面活性剤と、
b)　該試薬とペルオキシダーゼとの反応による光をアッセイ法で検出するためのペルオ

キシダーゼと、
を、それぞれ独立した容器に含むことを特徴とするキットに関する。
本発明はまた、過酸化水素を化学発光反応によってアッセイ法で検出するための改良された方法に関するものであって、化学式、

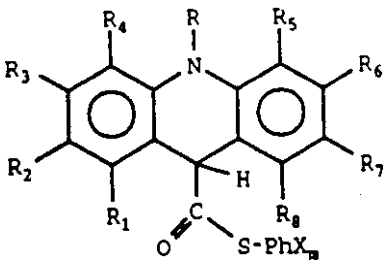


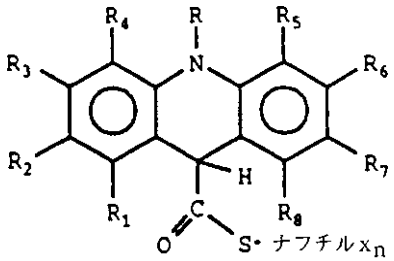
（ここで、Rはアルキル基、ヘテロアルキル基及びアラルキル基より選択される基、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基、Arは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させる置換及び未置換のアリール基（特に、フェニル基、ナフチル基及びビフェニル基）並びにヘテロアリール基（特に、ピリジル基、キノリル基及びキサンテニル基）から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンを、過酸化水素およびペルオキシダーゼと反応させることを含むことを特徴とする方法に関する。
本発明は、以下の少なくともひとつにおいて優れた特性を持つ、改良されたアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体に関する。即ち、発光持続時間が長い、発光光度か高い、最大発光光度までの立ち上がりが速い、バックグラウンドの発光レベルが低い、シグナル／バックグラウンド比が高い、化学発光検出試薬の貯蔵安定性が高い、膜上での発光が強い、などである。R基、R_1からR_8までの基及びAr基の組み合わせを変えることにより、用途に応じて最適な性能を有する化合物を選択することができる。
例えば、Ar基がパラ位にフルオロ基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシ基、又はメトキシ基で置換したフェニル基を持つアクルダンでは、光度の立ち上がりが速く、高いピーク光度が得られる。置換基として考えられるものには、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アラルキル基、アリール基、アルコキシル基、アルコキシアルキル基、ハロゲン原子、カルボニル基、カルボキシル基、カルボキシアミド基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリアルキルアンモニウム基及びニトロ基が含まれる。また、アリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体を含む化学発光試薬の貯蔵安定性を高めたい場合には、R_1からR_8までの基のうち少なくともひとつをアルキル基、アルコキシ基、アリールオキシ基などで置換するとよい。
好適な化合物の例としては、次式





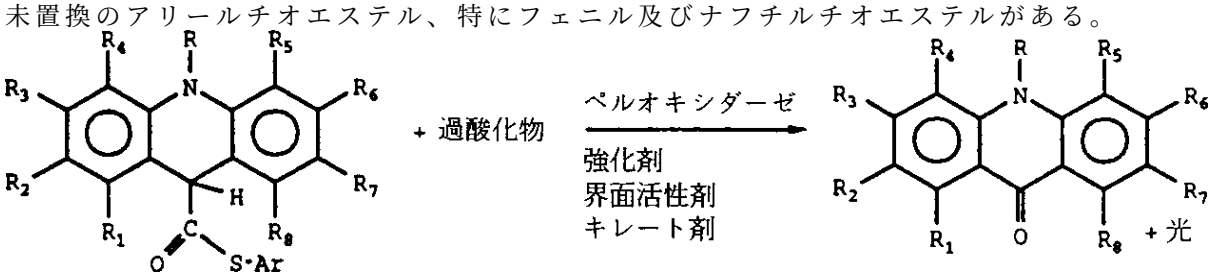
（ここで、Rはアルキル基、アラルキル基又はヘテロアルキル基であり、Xはハロゲン原子、トリハロメチル基、ニトロ基、シアノ基、アンモニウム基、カルボキシル基、カルボキシアミド基、アミノ基、置換されたアミノ基、アリール基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基及びヒドロキシ基より選択される基であり、mは0～5、nは0～7の数である）で表される化合物が挙げられる。
別の好適な化合物の例としては、次式





（ここで、R、X、m及びnは、上記で定義したとおりであり、R_1からR_8まではそれぞれ水素原子及び発光を生じさせる基より選択される基であり、R_1からR_8までの少なくとも1個は、水素原子以外の基である）で表される化合物が挙げられる。より好適な化合物の例としては上記化学式の中で、R_1からR_8までの少なくとも1個はアルコキシ基である化合物が挙げられる。

本発明によるアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体のうち、ある種のものは、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応し、アッセイにより適した化学発光特性を発揮する。この化学発光は、下記の一般反応式で示されるように、N-アルキルアクリドンまたはその置換体の励起状態から生ずると考えられる。該反応が進行することが見出されたアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレートの誘導体には、置換又は未置換のアリールチオエステル、特にフェニル及びナフチルチオエステルがある。



本発明は、ペルオキシダーゼ、過酸化化合物、および強化剤の作用によってアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体を酸化することにより、化学発光を起こすための方法に関する。本発明はまた、この方法を用いてペルオキシダーゼを高感度で検出するための方法に関する。さらに、本発明は、この方法を用いて、化学的または物理的にこの酵素に結合させた様々な生体分子を検出および定量するための方法に関する。さらに、本発明は、この方法を用いて、この酵素に結合可能な様々な生体分子を、例えば、ビオチンで標識した試料やストレプタビジン・ペルオキシダーゼ抱合体を使って検出および定量するための方法に関する。また、フルオレセインと抗フルオレセイン、ジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン、相補的配列を持つ核酸同士など、上記以外の親和性の高い一般的な物質の組を用いて、ペルオキシダーゼを試料物質に結合させることにより、本発明を適用することもできる。標識された有機分子または生体分子は、得られる化学発光の光度から直接定量することができる。この方法は、たとえば、イムノアッセイの技術によるハプテン、抗原、抗体の検出、ウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出、サザンブロッティングおよびノーザンブロッティングによるDNA、RNAの検出に用いることができる。さらに、この方法は、DNAの配列決定におけるDNA検出に用いることができる。さらに、この方法は、コレステロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ガラクトース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどの酵素が生成する過酸化水素の検出に用いることができる。したがってこの方法は、これら過酸化水素を生成する酵素の検出に用いることもできる。

本発明による反応は、緩衝液などの溶液中、またはビード、チューブ、マイクロウェルプレートもしくは膜などの固体担体の表面上で行うことにより、良好な結果が得られる。使用できる緩衝液としては、一般的な緩衝液のうち、pHを6～10程度に保つことができるものであればよく、たとえばホスフェート、ボレート、カーボネート、トリス（ヒドロキシメチルアミノ）メタン、グリシン、トリシン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、ジエ

タノールアミンなどが挙げられる。ただし、本発明を適用する際に具体的にどのような条件が適しているかは、たとえば、イムノアッセイ、ウェスタンブロッティング、サザンブロッティングなど、どんな用途に適用するかによって異なる。膜上での分析の場合は、使用する膜材料をキットの中に含めることもできる。

アリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体が過酸化物およびペルオキシダーゼに酸化されることにより生ずる化学発光は、高感度で検出することができる。化学発光を強化する物質でこの反応を促進すれは、さらに微量のペルオキシダーゼで化学発光を測定することが可能である。この酵素を分析したい生体分子と結合させることにより、その生体分子を高感度で検出することができる。

フェノール化合物の置換体のうち、ある種のものを、単独でまたは界面活性剤とともに反応混合系に加えると、添加されたペルオキシダーゼおよび過酸化物の存在下で生ずる化学発光を強化することができる。その結果、光度が増すか、発光持続時間が伸びるか、またはその両者を併せた効果が得られる。ペルオキシダーゼの関与するその他の反応を促進し、本発明による化学発光を強化することが分かっているフェノール化合物としては、p-フェニルフェノール、p-ヨードフェノール、p-ブロモフェノール、p-ヒドロキシケイ皮酸、2-ナフトール、6-ブロモ-2-ナフトールがあるが、これらに限定されるわけではない。また、この他のフェノール化合物および芳香族アミン化合物が本発明の範囲に含まれることは自明である。そのような化合物には、前記のG. Thorpe, L. Kricka, in Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives, J. Scholmerich, et al., Eds., pp. 199-208（1987）; M. Ii, H. Yoshida, Y. Aramaki, H. Masuya, T. Hada, M. Terada, M. Hatanaka, Y. Ichimori, Biochem. Biophys. Res. Comm., 193（2）, 540-5（1993）; U. S. Patent Nos. 5,171,668, 5,206,149などに記載されたホタルルシフェリン、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-（4-ヒドロキシフェニル）チアゾール、p-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2-クロロ-4-フェニルフェノール、1-ブロモ-2-ナフトール、1,6-ジブロモ-2-ナフトール、2-ヒドロキシ-9-フルオレノン、6-ヒドロキシベンゾキサゾール誘導体、4-ヒドロキシ-3-[3-（4-ヒドロキシフェニル）1-オキソ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オンなどがある。また、PCT/GB93 00271に記載されたような、ある種の有機ホウ素化合物は、強化剤となり得ることも、当業者にとって自明であり、本発明の範囲に含まれる。

ペルオキシダーゼの不存在下で起こる過酸化水素とアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体からのバックグラウンドの発光反応を抑制する添加剤は、本発明の有用性をさらに高めることができる。また、陰イオン、陽イオン及び非イオンのような、ある種の界面活性剤は、より大きな化学発光のシグナルを出し、シグナル／バックグラウンド比を高めることにより、本発明のアッセイでのペルオキシダーゼの検出感度を向上させることが分かった。これも、おそらくアクリダン誘導体の自動酸化による分解速度が低下することにより、ペルオキシダーゼ不存在下でのバックグラウンドの化学発光を最小化するためであると考えられる。

本発明による試薬の好適な成分組成を表1に示す。

表1

アクリダン5	0.01～10mM
フェノール強化剤	0.001 ～10mM
界面活性剤	0.005 ～5%
過酸化物	0.01～10mM
キレート剤	0.01～5mM

本発明は、緩衝液中に

1) フェノール強化剤またはその塩と、
2) 例えば過酸化水素、過酸化尿素、過ホウ酸塩などの過酸化化合物と、
3) 本発明によるアクリダン化合物と、
4) エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、エチレンビス（オキシエチレンニトリロ）四酢酸（EGTA）およびこれらの塩などのキレート剤から成る群より選択することができるカチオン錯化剤と、
5) ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）などのアニオン界面活性剤または、好ましくはポリオキシエチレン化アルキルフェノール、ポリオキシエチレン化アルコール、ポリオキシエチレン化エーテル、ポリオキシエチレン化ソルビトールエステルなどの非イオン界面活性剤、またはその他の界面活性剤と、
を含む水溶性緩衝液に関する。

本発明の好適な適用例として、pH6～8.5の緩衝液中に、終濃度約0.01M～1×10^{-6}Mのp-フェニルフェノールなどのフェノール化合物、終濃度約5%～0.005%（v/v）の非イオン界面活性剤、過酸化水素などの過酸化物源、または、好ましくは過ホウ酸塩もしくは過酸化尿素、終濃度約1×10^{-3}M～1×10^{-5}MのEDTAなどのカチオン錯化剤を含む水溶液を、本発明によるアクリダン化合物を含む第2の溶液と混合して終濃度が約0.001M～1×10^{-5}Mとなるようにし、検出用試薬溶液を調製する。この溶液を、溶液中または固体担体上に付着するペルオキシダーゼと接触させる。各成分の最適濃度は、分析毎に個別に決定する必要がある。特に、最大限の発光光度を得るため、アクリダン化合物と強化剤の濃度は、状況に応じて的確に決める必要がある。検出反応は、20～40℃前後の温度範囲で行うことが可能である。室温で行うのが容易であり、かつ良好な結果が得られる。

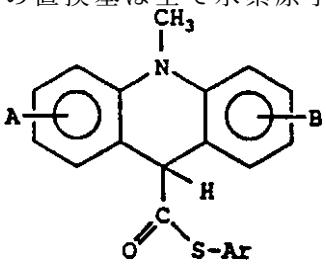
また、本発明のある種のアクリダンを用いた検出試薬組成物の貯蔵安定性が、本出願人による同時係属出願となるNo.08 061,810（1993年5月17日出願）及びNo.08/205, 093（1994年3月2日出願）で開示されたアクリダン化合物よりも、予想外に向上することが分かった。貯蔵安定性が増すことにより、試薬や費用を削減することができる。この方法にしたがって本発明による検出用試薬を保存すると、ペルオキシダーゼの作用によって生ずる化学発光の光量をより長い期間にわたって維持することができる。予期に反して、チオエステルの脱離基（leaving group）を有する本発明の試薬は、アリールエステルの脱離基を有する同様なアクリダンよりも安定性が大きいことが見られた。更に、本発明のアクリダン水溶液の貯蔵安定性は、前述のU.S.P.No.5,284,951及び5,284,952に記載されたアクリダン及びアクリジニウムアリールエステルの挙動と実質的に異なる。これらの2特許に開示されたアクリダンは、有用な貯蔵安定性を得る為にアリールエステル部分に、2個のオルソ位の電子供与性置換基と、メタ又はパラ位の電子吸引性置換基との、3個の置換基を必要とする。本発明のアクリダンは、良好な安定性を得るのに、オルソ位に如何なる電子供与性置換基をも必要としない。更に、本発明のアクリダン水溶液の安定性は、溶液からの酸素の除去と、約10℃以下の温度での貯蔵によって、一層向上させ得る。

本発明によるアリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体および試薬の大きな利点は、発光が良好なためペルオキシダーゼの検出感度が高いことと、アリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体が加水分解に対して安定であるということである。比較実験の結果、本発明による試薬は、ルミノールおよび強化剤を含む検出試薬と比較して、HRPの検出限界が100倍高いことが分かった。アリール N-アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体（－SAr）は、また発光能力でアルキルＮ－アルキルアクリダンチオカルボキシレート誘導体（－SR）より、予想外に優れている。また別の利点は、ペルオキシダーゼ濃度の測定におけるダイナミックレンジ（dynamic range）が広いことである。ある種のアリール N-アルキルアクリダンチオカルボン酸誘導体を用いることによる別の利点は、従来の化合物よりも化学発光の持続時間が長いことである。持続時間が長くなることにより、反応のタイミングを厳密に調整する必要がなくなるため測定が容易になるだけでなく、フィルムによる検出方法を用いた場合には検出感度が良くなる。

実施例

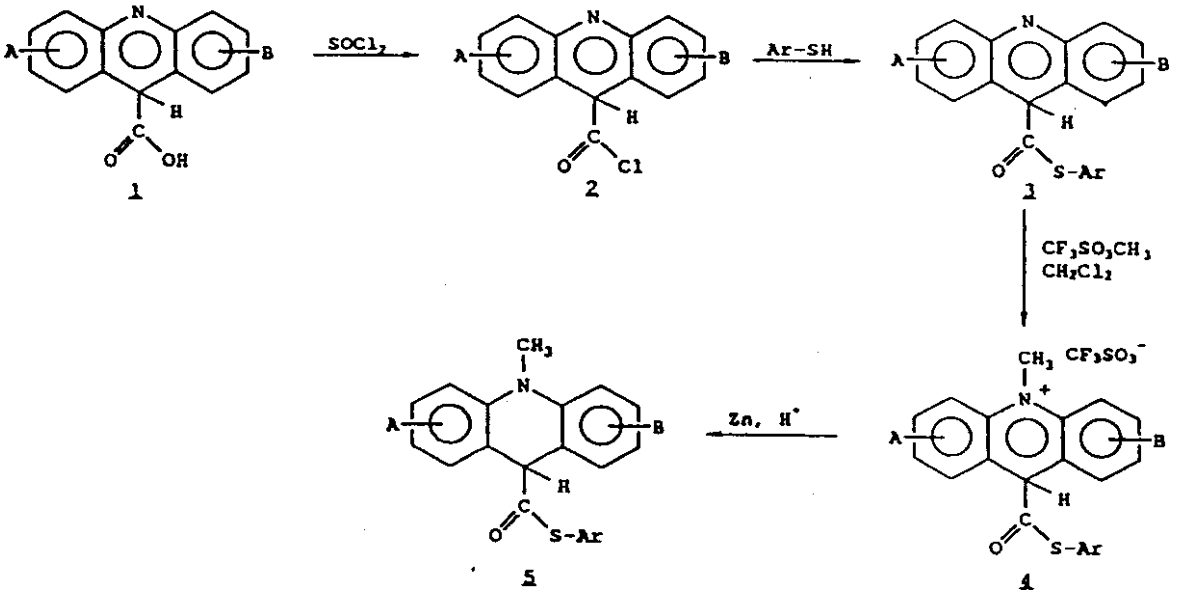
例1.アクリダン誘導体の合成

アクリダンカルボン酸誘導体の5a～5jを反応手順1に示す方法で、相応するアクリジン-9-カルボン酸から合成した。但し、化合物5bは例外で、その合成は、実施例3に詳述した。下記の構造で、置換基A及びBは、化学式（II）のR_1からR_8までの基に相応する。それ以外の置換基は全て水素原子である。



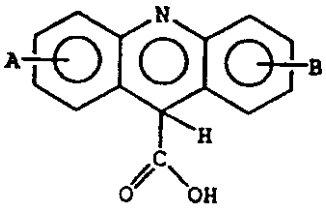
化合物	A	B	Ar
5a	H	H	フェニル
5b	H	H	4'－ヒドロキシフェニル
5c	H	H	2',6'－ジメチルフェニル
5d	H	H	4'－フルオロフェニル
5e	H	H	4'－トリフルオロメチルフェニル
5f	H	H	4'－メトキシフェニル
5g	H	H	2',6'－ジクロロフェニル
5h	H	H	2－ナフチル
5i	2-OCH_3	7-OCH_3	2－ナフチル
5j	3-OCH_3	H	4'－フルオロフェニル

反応手順1.



夫々対応するアクリジン-9-カルボン酸化合物1が、市販品から入手できない場合には、反応手順2記載の反応順序で製造した。

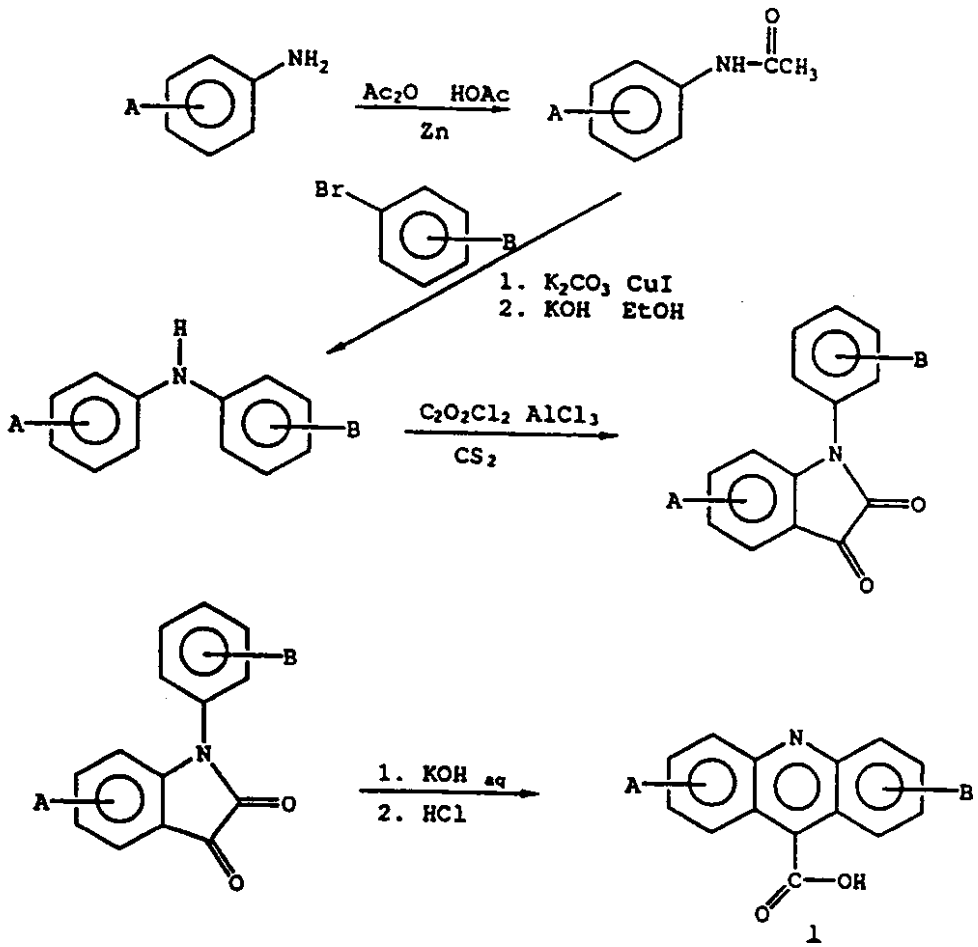
(G. Zomer, J. Stavenuiter, R. Van Den Berg, E. Jansen, In Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis, W. Baeyens, D. De Keukeleire, K. Korkidis, eds., Dekker, New York, 505-521, (1991); R. Stollé, J. Prakt. Chem., 105, 137, (1992)).



1

化合物	A	B
1a	H	H
1i	2-OCH_3	7-OCH_3
1j	3-OCH_3	H

反応手順2



化合2a、2i及び2jの一般的合成法

化合物1a、1i、1j（0.2～0.5g）を、過剰の塩化チオニル（3～10mL）に懸濁させ、反応混

液を3時間還流した。溶媒を減圧下で溜去して、黄色の固体として、2a、2i、2jを得、これを直接用いて、化合物3a、3c～jの製造に使用した。

化合3a、3c～jの一般的合成法

表に示された、相応する化合物1からの誘導体2を用い、これをアルゴン雰囲気下で塩化メチレンとピリジン（2～3当量）に溶解した。塩化メチレン中フェノール（1～1.5当量）の溶液を滴下した。溶液を室温で一晩中撹拌し、さらに塩化メチレン（100mL）で希釈し、水（3×30mL）で洗浄した。有機相をNa_2SO_4上で乾燥し、濃縮して生成物を得た。

化合物3	化合物1	塩化チオニル	チオフェノール		ピリジン
a	a 0.20g	7mL	チオフェノール	0.15g	0.14mL
c	a 0.50g	10mL	2,6－ジメチル－	0.34g	0.44g
d	a 0.50g	7mL	4－フルオロ－	0.31g	0.44g
e	a 0.50g	10mL	4－トリフルオロメチル－	0.427g	0.44g
f	a 0.50g	10mL	4－メトキシ－	0.336g	0.44g
g	a 0.50g	7mL	2,6－ジクロロ－	0.44g	0.44g
h	a 0.50g	10mL	2－ナフトール	0.395g	0.44g
i	i 0.90g	5mL	2－ナフトール	0.51g	2.0mL*
j	j+ 2.50g	30mL	4－フルオロ－	1.90g	1.17g

＊　ピリジンの代わりにトリエチルアミンを使用。

+ 1-メトキシーおよび3-メトキシーアクリダン　カルボン酸異性体の混合物を使用した。得ようとする化合物をクロマトグラフィで分離した。

化合物4a、4c～jの一般的合成法

化合物3（1～2mモル）をアルゴン雰囲気下で塩化メチレン（5～10mL）に溶解し、メチルトリフルオロメタンスルフォネート（5～10当量）を加えた。溶液を室温で一晩中撹拌し、薄い黄色沈殿物を得た。この沈殿物を濾過し、エーテルで洗浄し、乾燥して黄色結晶の生成物を得た。

化合物4	化合物3	CH_2Cl_2	$CH_3OSO_2CF_3$	
a	a 0.28 g	10 mL	1.00 mL	10 eq.
c	c 0.30 g	10 mL	0.692 mL	7 eq.
d	d 0.30 g	10 mL	0.713 mL	7 eq.
e	e 0.40 g	7 mL	0.826 mL	7 eq.
f	f 0.35 g	10 mL	0.803 mL	7 eq.
g	g 0.30 g	7 mL	0.883 mL	10 eq.
h	h 0.30 g	10 mL	0.633 mL	7 eq.
i	i 0.20 g	10 mL	1.0 mL	17 eq.
j	j 0.50 g	10 mL	1.0 mL	6.5eq.

化合物5a、5c、5h及び5jの一般的合成法（方法A）

化合物4（0.2～0.3mモル）を、無水エタノール（15～30mL）中に懸濁させ、溶液を10分間還流して、透明な溶液を得た。過剰の塩化アンモン（10～50当量）を、溶液に分割添加し、続いて亜鉛（NH_4Cl量と同当量）を添加すると、直ちに溶液が脱色された。無色の溶液を30分還流した。冷却した溶液を濾過し、沈殿物をエタノール（3×20mL）で洗浄した。溶液を濃縮し、クリーム状の固体を得、これを塩化メチレンに再溶解して、水（3×50mL）で洗浄した。塩化メチレンを蒸発して得た粗製物をシリカゲルのクロマトグラフにかけ（酢酸エチル／ヘキサン）、純粋な生成物を白色固体とて得た。

化合物5d、5e、5f、5g及び5iの一般的合成法（方法B）

化合物4（0.3～0.6mモル）を、氷酢酸10mL中に溶解し、黄色溶液を得、亜鉛（100当量）を加えると、直ちに溶液が脱色された。室温で5分間撹拌した後、反応混液の薄膜クロマトグラフによって、無極性物質であることが判った。酢酸をデカントし、固体を塩化メチレンで洗浄した。一緒にした有機溶液を蒸発させ、粗製の固体を得、これを塩化メチレンに再溶解し、2又は3～50mLの水で分割洗浄を行なった。塩化メチレンを蒸発させて得た粗

製物をシリカゲルのクロマトグラフ（20～30%の酢酸エチル／ヘキサン）にかけ、純品を、白い固体とて得た。

化合物5aから5jまで、及びその中間品を下表の如く製造した。

方法	化合物5	化合物4	亜鉛	エタノール	塩化アンモン	酢酸
A	a	a 0.15 g	2.00 g	30 mL	1.6 g	-
A	c	c 0.20 g	1.28 g	20 mL	1.28 g	-
B	d	d 0.20 g	1.3 g	-	-	10 mL
B	e	e 0.30 g	1.78 g	-	-	10 mL
B	f	f 0.23 g	1.47 g	-	-	10 mL
B	g	g 0.19 g	2.2 g	-	-	10 mL
A	h	h 0.25 g	1.5 g	25 mL	1.24 g	-
B	i	i 0.05 g	1.0 g	10 mL	1.0 g	-
A	j	j 0.20 f	1.0 g	30 mL	1.0 g	-

実施例2.化合物5aの合成

フェニル　アクリジン-9-チオカルボキシレート（3a）.

事実上純粋な生成物を更に減圧下で乾燥した。^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ7.48-8.32（m,13H）；^{13}C NMR（$CDCl_3$）δ121.40, 124.76, 126.79, 127.32, 129.59, 129.93, 130.24, 130.57, 134.61,142.18, 148.54, 193.91.

フェニル　10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート　トリフルオロメタンスルフォネート（4a）.^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ5.20（s,3H），7.61-7.86（m,5H），8.20-9.03（m,8H）.

フェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5a）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.45（s,3H），5.08（s,1H），6.98-7.36（m,13H）.^{13}C NMR（$CDCl_3$）δ33.52, 58.28, 113.79, 121.29, 121.41, 129.61, 129.81, 130.58, 135.13, 143.49, 150.37, 197.17.

実施例3. 化合物5bの合成

4'-（tert－ブチルジメチルシリルオキシ）チオフェノール.

無水DMF5mL中、4-ヒドロキシチオフェノール（1.0g、7.9mモル）と、tert-ブチルジメチルシリルクロリド（1.2g、7.9mモル）の溶液に、イミダゾール（1.07g、0.015モル）を徐々に加え、溶液を1時間撹拌した。薄層クロマトグラフ（シリカゲル、30%酢酸エチル／ヘキサン）で、反応の完結を確認した。溶液を25mLの水に注ぎ、3×25mLのヘキサンで抽出した。ヘキサン溶液を合体し、2×50mLの水で洗浄、無水Na_2SO_4で乾燥した。溶液を蒸発して、生成物として油状物質（1.8g）を得た。^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ0.162（s,6H），0.954（s,9H），3.35（s,1H），6.69-6.73（d,2H），7.16-7.19（d,2H）.

4'-tert-ブチルジメチルシリルオキシフェニル　アクリジン-9-チオカルボキシレート.

アクリジン-9-カルボン酸（1a）（1.45g、6.5mモル）を、塩化チオニル（10ml）中に懸濁させ、該反応混合物を3時間、還流した。溶媒を減圧下で除去し、黄色固体を得、これを、アルゴン雰囲気下で塩化メチレンとピリジン（4mL）に溶解した。4'-（tert-ブチルジメチルシリルオキシ）チオフェノール（1.85g、7.6mモル）を加え、溶液を室温で一夜撹拌した。反応混合物を、多量の塩化メチレン（200mL）で希釈し、水（3×50mL）で洗浄した。有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濃縮して粗製物を得、これをシリカゲル上、20%錯酸エチル／ヘキサンを用いてカラム・クロマトグラフで精製した。^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ0.216（s,6H），0.987（s,9H），6.85-8.26（m,12H）；^{13}C NMR（$CDCl_3$）δ-4.37, 18.21, 25.66, 118.17, 121.22, 121.37, 124.80, 127.11, 129.96, 130.35, 136.15, 142.22, 148.52, 157.59, 195.08.

4'-tert-ブチルジメチルシリルオキシフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート及び4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート

塩化メチレン（15mL）中、4-tert-ブチルジメチルシリルオキシフェニル アクリジン-9-チオカルボキシレート（1g、2.2ミリモル）の溶液に、アルゴン雰囲気下でメチルトリフルオロメタンスルフォネート（7.2g、0.04モル）を加えた。反応混合物を室温で2日間撹

拌し、黄色沈殿を得た。沈殿を濾過、乾燥し、黄色結晶を得たが、これはシリル化した塩と、脱シリル化した塩との混合物（45:55）であった。

4'-tert-ブチルジメチルシリルオキシフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート ^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ0.261（s,6H），1.003（s,9H），5.17（s,3H），7.04-7.07（d,2H），7.67-7.70（d,2H），8.18-9.02（m,8H）；

4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート ^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ5.16（s,3H），6.95-6.99（d,2H），7.56-7.59（d,2H），8.18-9.00（m,8H），9.12（s,1H）．

4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5b）

方法A. 4'-tert-ブチルジメチルシリルオキシフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネートと、4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネートとの混合物（1g）を無水エタノール（75ml）に懸濁させ、混合物を10分間還流し、溶液とした。塩化アレモン（8.0g、0.149モル）を溶液に少し宛加え、次に亜鉛（9.5g、0.146モル）を加えた。亜鉛を加えた直後に、溶液の黄色が、脱色された。無色の溶液を3時間還流した。反応混合物の薄層クロマトグラフにより、2種の無極性物質に完全に転化したことが判った。溶液を濾過し、無機性固体をエタノール（3×20ml）で洗浄した。合体した有機性溶液を濃縮し、固体を得、これを塩化メチレンに再溶解した。塩化メチレンを水（3×50mL）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥し、濃縮してシリル化した生成物と、脱シリル化した生成物とを得た。この混合物を分離し、シリカゲル上、30%酢酸エチル／ヘキサンを用い、クロマトグラフで精製し、白色固体の生成物を得た。^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ3.39（s,3H），5.17（s,1H），6.82-7.37（m,12H），8.73（bs,1H）；^{13}C NMR（アセトン-d_6）δ33.01, 57.57, 113.23, 116.45, 117.91, 120.86, 129.03, 130.02, 136.40, 142.88, 149.80, 158.79, 197.64.

実施例4.化合物5cの合成

2',6'-ジメチルフェニル アクリジン-9-チオカルボキシレート（3c）.^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ2.68（s,6H），7.32-7.38（m,3H），7.67-8.47（m,8H）．

2',6'-ジメチルフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレートトリフルオロメタンスルフォネート（4c）.^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ2.68（s,6H），5.23（s,3H），7.40-7.47（m,3H），8.26-9.07（m,8H）．

2',6'-ジメチルフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5c）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ2.09（s,6H），3.46（s,3H），5.08（s,1H），6.97-7.36（m,11H）．

実施例5.化合物5dの合成

4'-フルオロフェニル アクリジン-9-チオカルボキシレート（3d）.^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ7.17-7.47（m,4H），7.67-8.29（m,12H）．

4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート（4d）.^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ5.19（s,3H），7.38-9.04（m,12H）．

4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5d）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.46（s,3H），5.08（s.1H），6.96-7.38（m,12H）．

実施例6.化合物5eの合成

4'-トリフルオロメチルフェニル アクリジン-9-チオカルボキシレート（3e）.^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ7.64-8.31（m,12H）．

4'-トリフルオロメチルフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート（4e）.^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ5.23（s,3H），8.01-9.07（m,12H）．

4'-トリフルオロメチルフェニル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5e）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.46（s,3H），5.10（s,1H），7.00-7.55（m,12H）．

実施例7.化合物5fの合成

4'-メトキシフェニル　アクリジン-9-チオカルボキシレート（3f）.^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.86（s,3H），6.99-7.02（d,2H），7.54-7.57（d,2H），7.61-8.28（m,8H）.
4'-メトキシフェニル　10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート　トリフルオロメタンスルフォネート（4f）.^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ3.90（s,3H），5.19（s,3H），7.12-7.15（d,2H），7.73-7.76（d,2H），8.20-9.04（m,8H）.
4'-メトキシフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5f）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.45（s,3H），3.76（s,3H），5.07（s,1H），6.81-7.35（m,12H）.
実施例8.化合物5gの合成
2',6'-ジクロロフェニル　アクリジン-9-チオカルボキシレート（3g）.^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ7.44-7.62（m,3H），7.66-8.36（m,8H）.
2',6'-ジクロロフェニル　10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレートトリフルオロメタンスルフォネート（4g）.^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ5.19（s,3H），7.38-9.04（m,11H）.
2',6'-ジクロロフェニル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5g）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.47（s,3H），5.08（s,1H），6.99-7.38（m,11H）.
実施例9.化合物5hの合成
2'-ナフチル　アクリジン-9-チオカルボキシレート（3h）.^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ7.57-8.29（m,15H）.
2'-ナフチル　10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレート　トリフルオロメタンスルフォネート（4h）.^{1}H NMR（アセトン-d_6）δ5.19（s,3H），7.67-9.03（m,15H）.
2'-ナフチル　10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5h）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.47（s,3H），5.13（s,1H），7.01-7.79（m,15H）.
実施例10.化合物5iの合成
2'-ナフチル　2,7-ジメトキシアクリジン-9-チオカルボキシレート（3i）.^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ4.024（s,6H），7.265-7.281（t,2H），7.425-7.466（dd,2H），7.564-7.669（m,3H），7.86-7.97（m,3H），8.095-8.125（d,3H）.
2'-ナフチル　2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレートトリフルオロメタンスルフォネート（4i）.^{1}H NMR（DMSO-d_6）δ4.146（s,6H），4.876（s,3H），7.472-7.480（d,2H），7,669-7.708（m,2H），7.844-7.878（dd,1H），8.049-8.155（m,5H），8.481（s,1H），8.800-8.835（d,2H）.
2'-ナフチル　2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5i）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.401（s,3H），3.813（s,6H），5.042（s,1H），6.902-6.926（m,6H），7.265-7.300（dd,1H），7,428-7.468（m,2H），7.708-7.790（m,4H）.
実施例11.化合物5jの合成
4'-フルオロフェニル　3-メトキシアクリジン-9-チオカルボキシレート（3j）.生成物を、シリカゲル上、15%錯酸エチル／ヘキサンを用い、カラムクロマトグラフで更に精製し、生成物を得た。^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ4.034（s,3H），7.171-7.230（t,2H），7.307-7.346（dd,1H），7.486-7.494（d,1H），7.561-7.651（m,3H），7.787-7.84（m,1H），7.989-8.021（d,1H），8.068-8.094（d,1H），8.174-8.202（d,1H）.
4'-フルオロフェニル　3-メトキシ-10-メチルアクリジニウム-9-チオカルボキシレートトリフルオロメタンスルフォネート（4j）.^{1}H NMR（DMSO-d_6）δ4.259（s,3H），4.769（s,3H），7.476-7.535（t,2H），7.707-7.746（dd,1H），7.863-7.869（d,1H），7.937-8.054（m,3H），8.398-8.452（t,1H），8.475-8.507（d,2H），8.766-8.797（d,1H）.
4'-フルオロフェニル　3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレート（5j）.方法A. ^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ3.434（s,3H），3.857（s,3H），5.025（s,1H），6.540-6.601（m,2H），6.963-7.037（m,4H），7.193-7.370（m,5H）.
化学ルミネセンスの測定
下記の例の実験は、光の減衰についてのニュートラル密度フィルター（neutraldensity filter）を備えたターナー・デザインズ（Turner Designs）TD－20e（Sunnyvale, CA）ルミノメーターか、又はラブシステムズ　ルミノスカン（Helsinki, Finland）ルミノメー

ターを用いて行なった。データの収集、解析及び表示はソフトウェアで抑制した。

実施例12. 化合物5a～j、及び2種の他のアクリダンによるHRPの検出に関する光度－時間分布の比較

3試薬は、別々に、各40μLを、HRPを1.4×10^{-16}モルを含む水溶液1μLと反応させた。3試薬の組成は、夫々次の通りである。

（1）0.05mMのアクリダン化合物5a～jを含むpH8.0のトリス緩衝液0.01M、0.4mMの尿素過酸化物、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTween20、1mMのEDTA。

（2）アクリダン5の代わりに、フェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同一組成の試薬（本出願人による同時係属出願となるNo.08/061,810）。

（3）アクリダン5の代わりに、先に報告したアクリダンであるエチル 10-メチルアクリダン-9-チオカルボキシレートを含む以外まったく同じ組成の試薬（F. McCapra, Pure Appl. Chem., 24, 611-629（1970））。

図1～8に、この条件下で本発明の種々のアクリダン5を含む試薬を使用すると、他のアクリダンの試薬に比べて、光放射が改良されることを示す。

実施例13. 処方の最適化

pH8.0のトリス緩衝液（0.01～0.2M）中、p-ヨードフェノール（0.1～2.25mM）と、過酸化尿素（0.1～1mM）と、Tween20（0～0.6%）と、2.5%（v/v）の2-メトキシエタノールとを含む溶液に、アクリダン5a、5d及び5e（0.1～0.076mM）を用いて、最適化の基本的な実験を行なった。酵素1.4×10^{-15}から1.4×10^{-19}モルの範囲内で、HRPの検出につき、感度とダイナミックレンジを評価した。特に有効な試薬の組成は、pH8.0（0.01M）のトリス緩衝液中で、アクリダン（0.05～0.075mM）、p-ヨードフェノール（1.1mM）又はp-フェニルフェノール（0.1mM）、過酸化尿素物（0.4～0.6mM）、1mMのEDTA、Tween20（0.025%）からなる。これらの条件では、各アクリダン化合物に対して試験した、酵素の全範囲に亘って、HRPに関して直線的な分析結果を得た。

実施例14. ルミノールに対する、アクリダン5a、5d、5e及び5jによるHRPの検出感度の比較

本発明の試薬と、ルミノールを含む市販品の最適試薬（Amersham ECL）とを用いて、HRP検出の直線性を比較した。それぞれの実験で、表に記載した如く、アクダリン5a、5d、5e又は5jをそれぞれ含有する溶液各40μLと、市販の試薬（Amersham ECL、メーカーの指示に従って作られたもの）40μLとを、酵素1.4×10^{-15}乃至1.4×10^{-19}モルを含有するHRPのアリコート1μLと室温で混合した。図9～12は、アクダリン5a、5d、5e又は5jをそれぞれ含む試薬を用いて測定したHRP量の直線範囲の比較である。アクダリン5a、5d、5e又は5jを含有する試薬からのデータは、15分の所で測定したが、ECL試薬からのデータは、光度の上昇と減衰が早いため、また、試薬に対する酵素量でピーク時間が変るため、光度の最大の点で測定した。アクダリン5a、5d、5e又は5jを含有する試薬は、ECL試薬よりも100倍の検出感度が可能であった。アクダリン5a、5d、5e又は5jを含有する試薬を用いると、同様な感度については、より早い時間で測定できた。

アクリダン	過酸化物	フェノール	TWEEN 20	緩衝液
5a	0.05 mM	0.4 mM UP	1.1 mM IP	0.025 %	0.01 M tris, pH 8.0
5d	0.075 mM	0.4 mM UP	0.1 mM PP	0.025 %	0.01 M tris, pH 8.0
5e	0.075 mM	0.4 mM UP	0.1 mM PP	0.025 %	0.01 M tris, pH 7.0
5j	0.075 mM	0.6 mM UP	0.1 mM PP	0.025 %	0.01 M tris, pH 8.0

実施例15. アクリダン含有ホースラディッシュ（西洋カラシ）ペルオキシダーゼ検出試薬の安定性

検出試薬は、適宜二つの容器に貯蔵し、第一溶液は過酸化物、フェノール強化剤、TWEEN20及びEDTAを含有する水性緩衝液を含み、第二の溶液は1対1のエタノール／p-ジオキサン又は、好ましくは、2-メトキシエタノール或いは１対１のプロピレングリコール／エタノールのような水混和性の有機溶剤中にアクリダン化合物5を含む。この方法で貯蔵すると

、試薬組成物は数か月安定である。最終検出試薬は使用前に二溶液の適量を混合して作る。本発明のアクリダンの利点は、最終検出試薬混合物の安定性が大なることである。安定性は、一定量のHRPと反応したアリコート溶液からのピーク光度を測定することによって評価した。pH8.0のトリス緩衝液0.01M中に化合物5d又は5j（0.075mM）、p-フェニルフェノール（0.1mM）、過酸化尿素（0.4mM-5d、0.6mM-5j）、TWEEN20（0.025%）、EDTA（1mM）、2.5%2-メトキシエタノールを含有する2種の検出試薬各41μLと、1.4×10^{-16}モルのHRPとを室温で反応させたもので、24時間貯蔵したものから得たピークの光度を、貯蔵前の値の百分率（$\%I_{max}$）として以下に示す。

化合物	貯蔵時間(hr)	$\%I_{max}$
5d	24	99
5j	24	100

アクリダン5d、5e及び5fで行った他の実験でも特に優れた安定性が得られた。

実施例16.　緩衝液のpHの影響

pH範囲7.0～9.0における0.01Mのトリスか、またはpH範囲6.0～6.5における0.01Mのリン酸カリウムのいずれかを用い、実施例13の組成に従って検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬バックグランドに対するシグナルの最善の比は、pH6～8.5の範囲による試薬で得られた。

実施例17.　緩衝塩の影響

種々の緩衝溶液に置き換えた以外は、実施例13の組成に従って、検出試薬溶液を作成し、HRPと反応させた。試薬のバックグランドに比して有用な光り強度のレベルは、トリス塩酸（tris hydrochloride）、トリス酢酸（tris acetate）、トリス・マレート（tris malate）、燐酸カリウム、ジグリシン-水酸化ナトリウム及びトリシンの緩衝液から調製された試薬で得られた。

実施例18.　強化剤の影響

種々のフェノール系強化剤に置き換え、実施例13の組成に従って検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬のバックグランドに比して有用な光度レベルは、p-ヨードフェノール、p-ヒドロキシシンナミックアシッド及びｐ－フェニルフェノールを含有する試薬で得られた。

実施例19.　過酸化物の影響

種々の過酸化物に置き換え、実施例13の組成に従って、検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬のバックグランドに比して有用な光度レベルは、過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム及び過酸化尿素を含有する試薬で得られた。

実施例20.　界面活性剤の影響

種々の界面活性剤に置き換え、実施例13の組成に従って、検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬のバックグランドに比して有用な光度のレベルは、TWEEN20（Aldrich,Milwaukee,WI）、TRITON X-405（Aldrich）、BRIJ 35（Aldrich）、ナトリウムドデシルサルフェート、セチルトリメチルアムモニウム　ブロマイド、β-シクロデキストリン及びデキストランサルフェートを含有する試薬で得られた。

実施例21.　ウェスターンブロットによる蛋白質の改良された化学発光検出法

ウサギ抗ヤギIgGペルオキシダーゼ抱合体をカペルプロダクツ（Durham,NC）から得た。ヒトトランスフェリンと、分画したヤギ抗ヒトトランスフェリン血清をシグマケミカル社（St. Louis,MO）から購入した。IgGのサンプルは、2分間10,000gで遠心分離し、上澄液を免疫学的反応に使用した。PVDFの伝達膜（transfer membrane）（IMMOBILON P）はミリポア社（Bedford,MA）から入手した。コダック（Rochester,NY）のX-OMAT ARフイルムをアッセイ法に使用した。

SDS-PAGEをラエムリ（U.K.Laemmli,Nature（London）,227,680（1970））に記載された緩衝液システムを用いて実施した。スタッキングゲル（stacking gel）は、4.38%アクリルアミド:0.12%ビスアクリルアミドとした。セパレーティングゲル（separating gel）は6

.81%アクリルアミド:0.19%ビスアクリルアミドとした。電気泳動の後、ゲルは伝達緩衝液（transfer buffer）と7～8分間平衡状態にあった。その緩衝液は、20mMのトリスと153mMのグリシンと20%（v/v）メタノールとを含有するものとした。そのゲルを伝達膜のシートとクロマトグラフィー紙3MM（Whatman）のシートとの間に挟持したものをトランスファーユニット（Bio-Rad Laboratories,Richmond,CA）中に設置した。ゲル中の蛋白質を、100ボルトの一定電圧下4℃で25分間電気溶離した。その後膜を、pH7.4のトリス-HCl緩衝液の生理的食塩水（TBS）50mM中に4℃で一晩中放置した。その後、膜を15分間TBSで洗浄した。

膜を、1%の無脂肪粉乳（NFM）を含有する、pH7.4のトリス-HCl緩衝液の生理的食塩水中における0.05%のTWEEN-20（T-TBS）で、室温にて1時間処理した。このブロックした膜を、1%NFMを含有するT-TBSを用い、一次抗体（ヤギ抗ヒトトランスフェリンIgGフラクションの1500分の1の希釈液）と、室温で75分間インキュベートした。

次いで、膜を濯ぎ、室温でT-TBSで5分ずつ3回洗浄した。洗浄した膜を室温で1時間、二次抗体（ウサギ抗ヤギIgGペルオキシダーゼ抱合体の50,000分の1の希釈液）と、1%NFMを含有するT-TBSを用いて、インキュベートした。膜をすすぎ、室温でT-TBSで10分ずつ4回洗浄し、更にTBSで5分洗浄した。

洗浄した膜を、4種の検出試薬の一つに5分間浸積し、脱水して、透明なフイルムのシートの間に置いた。試薬Aは、ルミノール（Amersham ECL）を含有する市販の試薬とした。試薬Bは、本出願人による同時係属出願となるNo.08 061,810に開示されたアクリダンである4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含有したものである。試薬Cは、アクリダン5aを含有したものである。15分間インキュベートした後、エックス線フィルムを種々の時間膜に暴露し、現像した。アクリダン化合物を含有する検出試薬溶液の組成は以下の通りである。

トリス緩衝液、pH8.8	0.1M	
アクリダン	0.05mM	
p-ヨードフェノール		1.1mM
TWEEN 20		0.5%（w/w）
$NaBO_3 \cdot 4H_2O$	2.5mM	
EDTA	0.5mM	
p-ジオキサン	1.25%	
エタノール	1.25%	

用いたトランスフェリンの標準は、コダックのX-OMAT AR X線フィルムに15秒暴露した後、バックグランド上で5pg slotまで鮮明に見ることができた。膜が光りを放射し続けたので24時間の間に膜の暴露を何回もすることができた。図13は、14分インキュベートし、15秒暴露した実験の、デジタルでスキャンしたX線フィルムの画像である。その結果、本発明のアクリダン5aで、良い画像が得られた。

実施例22. サザンブロットの化学発光検出

マウスの遺伝子DNA（Clontech Laboratories. Inc.,Palo Alto, CA）を、50μg/mLの濃度で制限酵素EcoR1（Boehringer-Mannheim）で完全に（to completion）分割した。制限したDNAをフェノール／クロロホルムで1回、クロロホルムで1回抽出して精製し、エタノールで沈澱させた。精製したDNAを、それぞれ34μgと17μgの2部分に分け0.77%のアガロースゲルの電気泳動で分離した。電気泳動の緩衝液は40mMのトリスアセテートと2mMのEDTA（pH8.0）とした。電気泳動の後、ゲルを水で濯ぎ、次いで0.25Nの塩酸に12分穏やかに撹拌しながら浸漬した。

マグナグラフ ナイロン（Micron Separations Inc.,Westboro,MA）を続けて水と10X SSC（20X SSCは3Mの食塩と0.3Mのクエン酸ナトリウムで、pH7.0）にそれぞれ2分と10分浸漬した。ゲルを水で濯ぎ、次いで0.5M NaOH/1.5M NaClで2回、それぞれ15分と30分濯いだ。ゲルを水で濯ぎ、後1Mトリス塩酸（pH7.5）/1.5M食塩水で15分ずつ3回処理した。ゲル中のDNAを毛細管で膜に移し、10X SSCを用いて一夜ブロッティングした。ブロットを30分風乾し、次いで80℃で2時間加熱した。

0.5Nの食塩と5%のブロッキング剤（Amersham#RPN.3000）を含有するハイブリッド形成緩衝液（Amersham#RPN.3000）中で、膜を42℃で60分間随時撹拌しながらプレハイブリッド操作をした。ハイブリッド形成プローブのv-mos DNA（Clontech Lab.Inc.）をメーカーの仕様（Amersham#RPN.3000）に従って、HRPで標識し、0.5N食塩、5%のブロッキング剤および300ng/mLのHRPで標識したv-mos DNAを含有するハイブリッド形成緩衝液を用いて、42℃で一夜ハイブリッド形成を進行させた。続けて室温で、膜を0.5X SSC/0.4%SDSで、5分及び30分洗い、その後、55℃でそれぞれ15分、3回洗い、更に2X SSCで2回、それぞれ5分室温で洗浄した。

膜を水で濯ぎ、過剰の溶液を除く為、3MMのブロッティングペーパー上に1分間放置し、その後きれいな容器に移し、本発明のアクリダン5aを含有する実施例21の検出試薬を加えた。9分間インキュベートした後、過剰の溶液を除去し、ブロットを透明なフィルムのシートの間に挟んで、コダックのX-OMAT XAR 5のフィルムに暴露した。

図14に示したように、本発明の試薬は、10分間暴露しただけで、マウスの遺伝子DNAのシングル複製遺伝子の検出に使うことができる。17μgのリーディングトラック（leading tracks）においてターゲットDNA70pg（7.9×10^{-17}モル）とすると、ターゲット制限断片は14kbである。本発明の試薬を用いれば、シングル複製遺伝子はブロットの両方のトラックで、明瞭に目視できる。

前記に述べたものは、本発明の例示に過ぎないものであって、本発明は請求の範囲によってのみ制限される。

【図１】

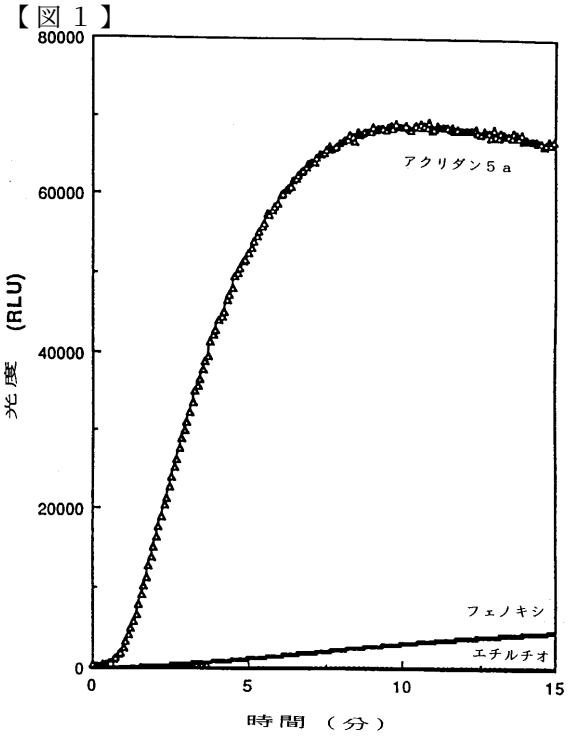


FIG. 1

【図２】

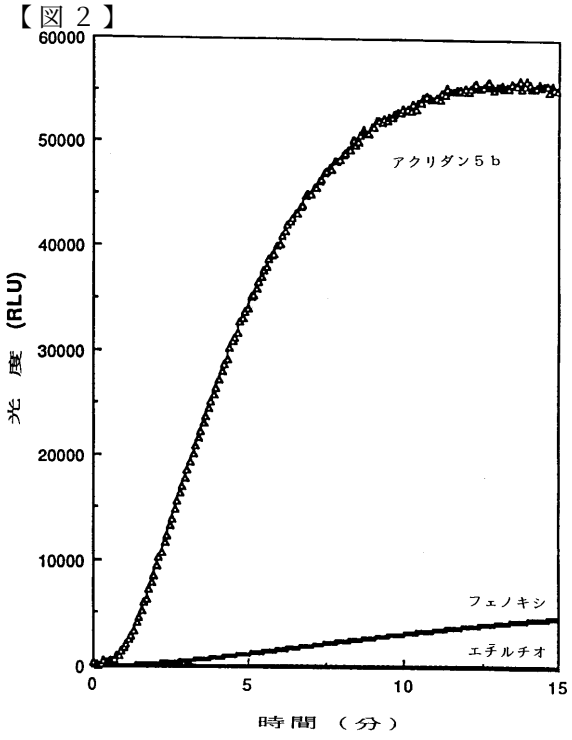


FIG. 2

【図３】

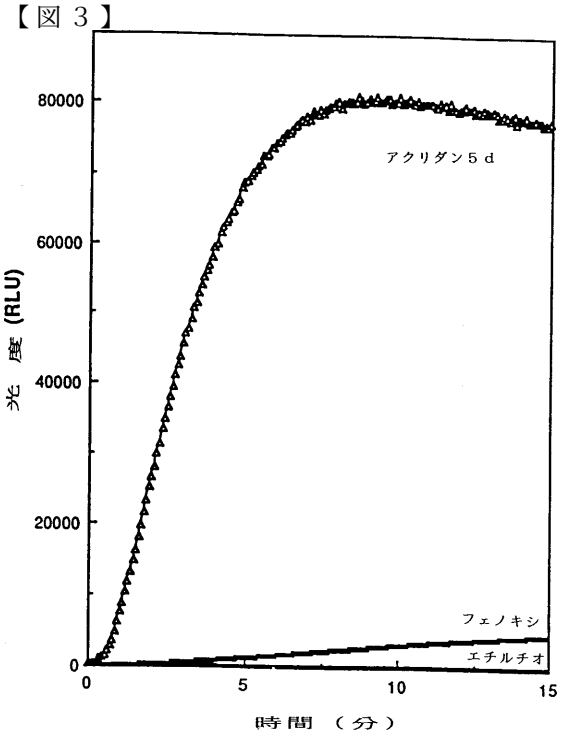


FIG. 3

【図４】

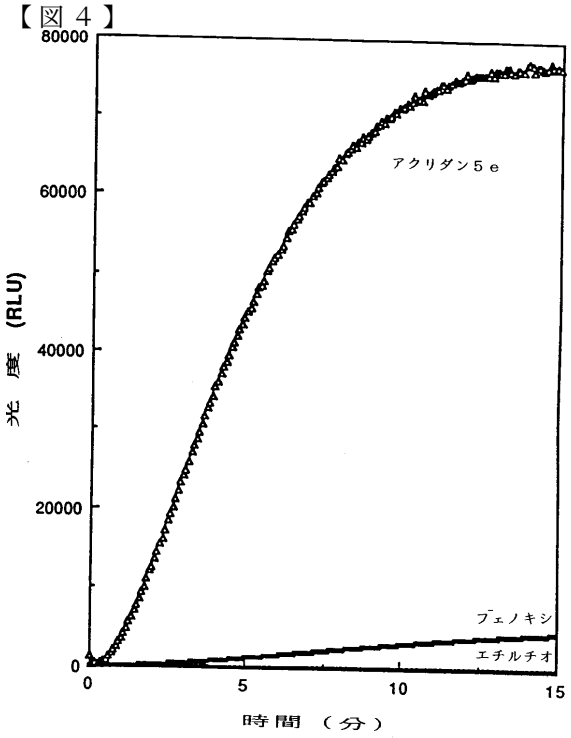


FIG. 4

【図５】

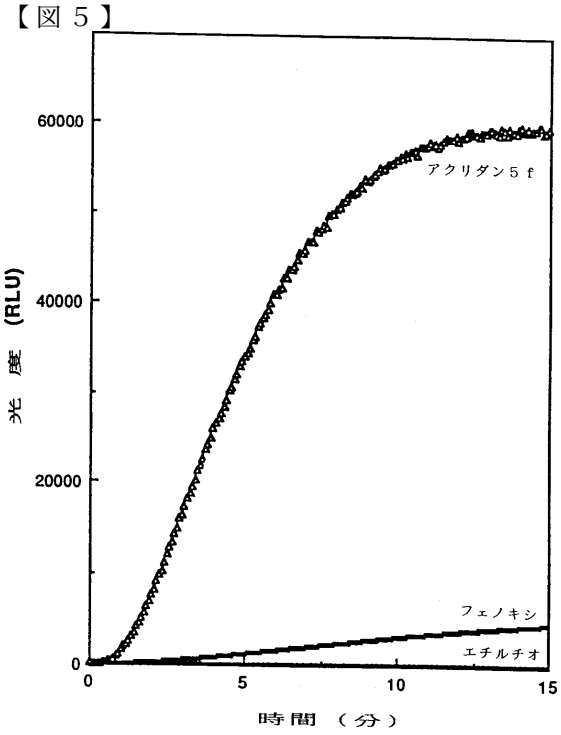


FIG. 5

【図６】

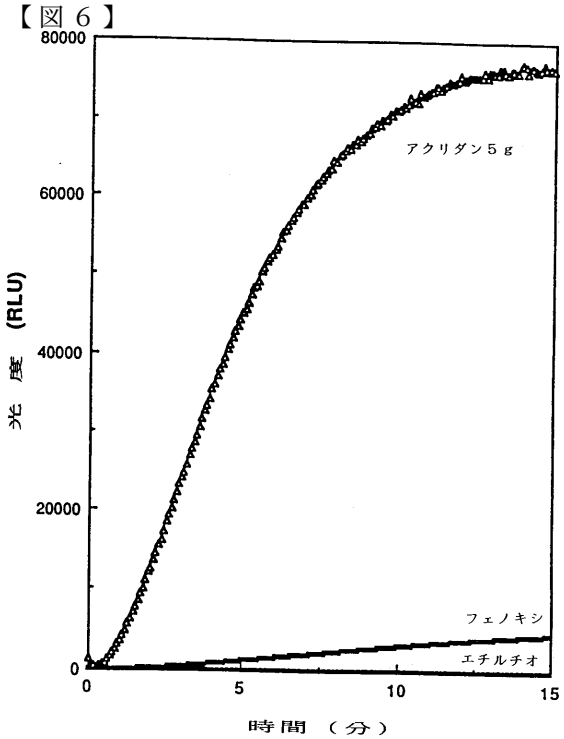


FIG. 6

【図７】

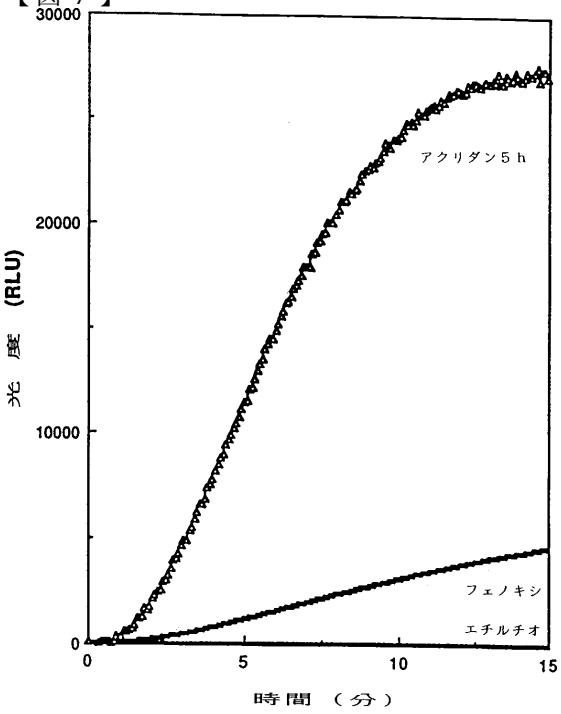


FIG. 7

【図８】

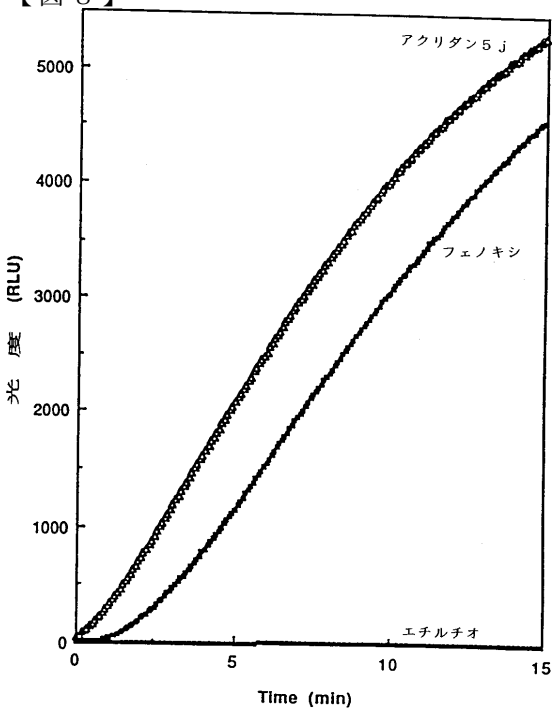


FIG. 8

【図９】

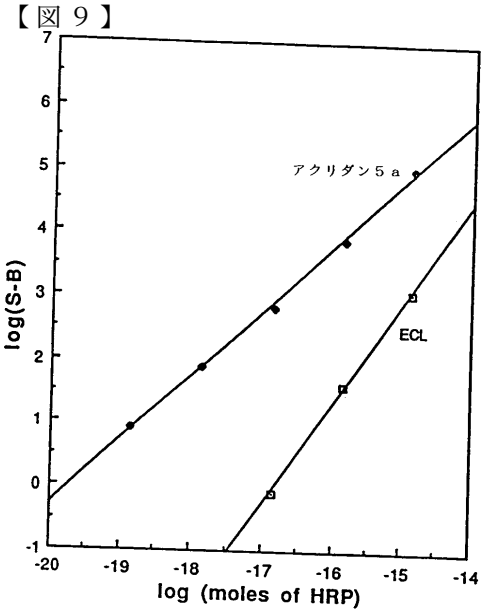


FIG. 9

【図１０】

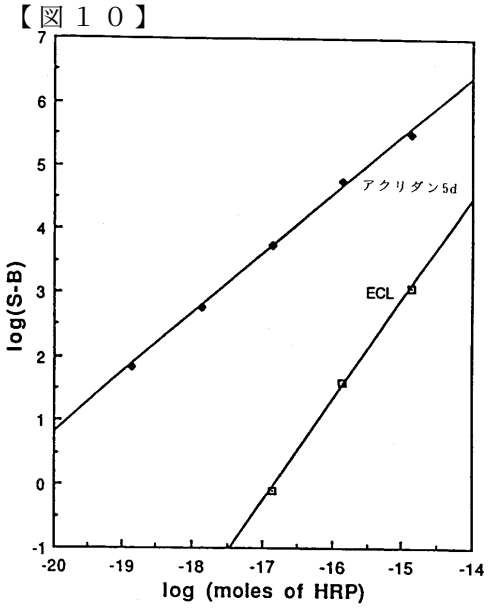


FIG. 10

【図１１】

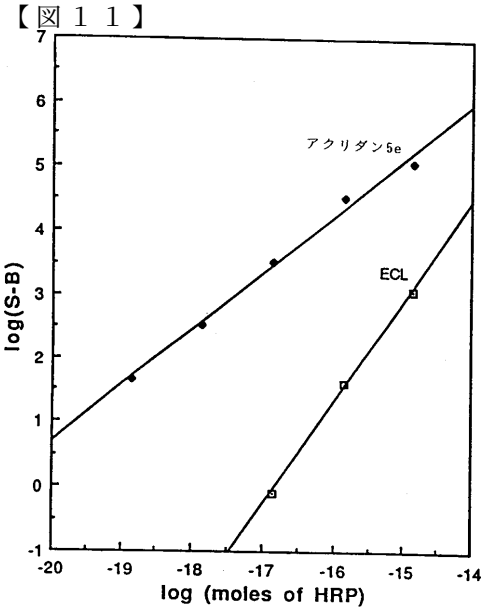


FIG. 11

【図１２】

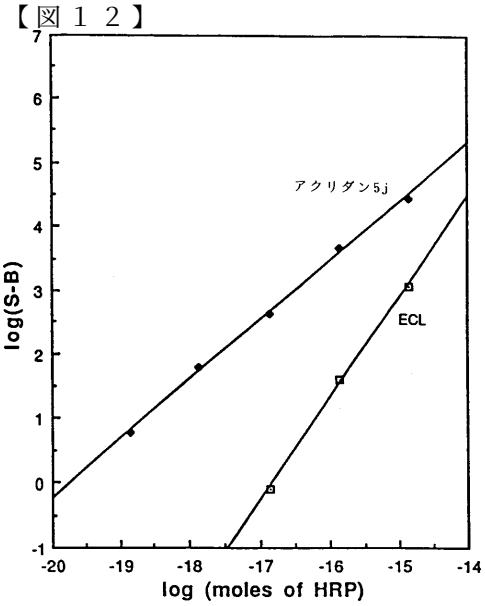
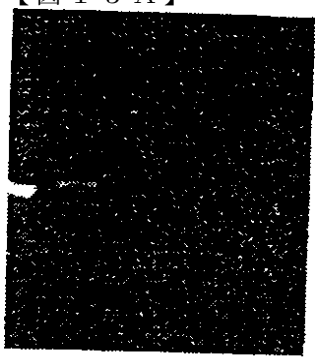


FIG. 12

【図１３Ａ】



1 2 3 4 5

FIG. 13A

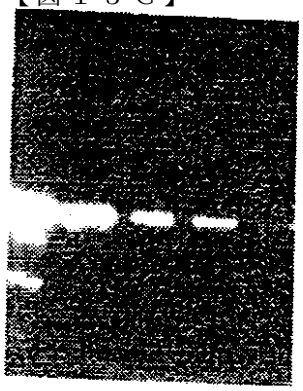
【図１３Ｂ】



1 2 3 4 5

FIG. 13B

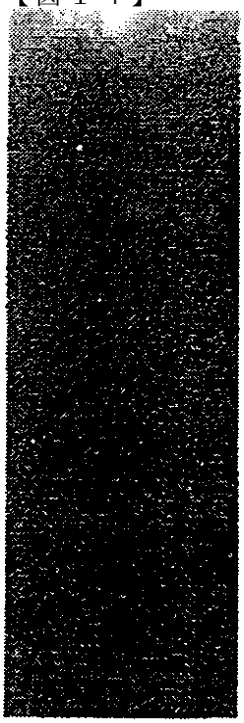
【図１３Ｃ】



1 2 3 4 5

FIG. 13C

【図１４】



160 80 pg

FIG. 14

フロントページの続き

(72)発明者　レヌカ　デシルヴァ
アメリカ合衆国　ミシガン　４８１６７　ノースヴィル　デルタ　ドライブ　４０６２８
(72)発明者　ザーラ　アルガバニ
アメリカ合衆国　ミシガン　４８３１０　スターリング　ハイツ　リアン　ロード　３３８５８

審査官　櫛引　智子

(56)参考文献　特表平０３－５０１７７２（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－０５７５７２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C09B 15/00
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)